THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole Doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

Charlotte Plestant

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude de l'influence de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules au cours de la formation des contacts cellulaires et de la croissance neuritique

Soutenance prévue le jeudi 27 Septembre 2012

devant le jury composé de :

Monsieur Jean-Christophe Larcher	Président du Jury
Madame Cécile Gauthier-Rouvière	Rapporteur
Monsieur Olivier Thoumine	Rapporteur
Madame Annie Andrieux	Examinateur
Monsieur René-Marc Mège	Directeur de thèse

Table des matières

Figures ..... **IV**

Tableaux ..... **VI**

Liste des abréviations ..... **VII**

Résumé ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

INTRODUCTION ..... **- 1 -**

Chapitre I : Les Cadhérines ..... - 2 -

1. Les molécules d'adhésion cellulaire ..... *- 2 -*

1.1. Les jonctions cellulaires ..... - 3 -
1.1.1. Les jonctions serrées ..... - 4 -
1.1.2. Les jonctions communicantes ..... - 4 -
1.1.3. Les jonctions d'ancrage ..... - 4 -
1.2. La migration cellulaire ..... - 6 -

2. Les contacts intercellulaires dépendants des cadhérines ..... *- 7 -*

2.1. Structure des cadhérines ..... - 8 -
2.2. Les caténines, partenaires intracellulaires des cadhérines ..... - 12 -
2.2.1. La caténine p120 ..... - 12 -
2.2.2. La β-caténine ..... - 13 -
2.2.3. L'α-caténine ..... - 14 -
2.2.4. La vinculine ..... - 15 -
2.3. Régulation de l'expression des cadhérines à la surface cellulaire ..... - 16 -
2.3.1. Adressage des cadhérines à la membrane plasmique ..... - 16 -
2.3.2. Régulation du maintien des cadhérines à la membrane plasmique ..... - 16 -
2.4. L'établissement des contacts intercellulaires dépendants des cadhérines ..... - 18 -
2.4.1. Mécanismes d'interaction en *trans* des ectodomaines de cadhérine ..... - 18 -
2.4.2. Interactions *cis* et *trans* et croissance des adhésions dépendantes des cadhérines ..... - 21 -
2.4.3. Contribution du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'ancrage des cadhérines à l'actine dans l'établissement des contacts ..... - 22 -
a. Le cytosquelette d'actine ..... - 22 -
b. Modes d'association des cadhérines à l'actine ..... - 25 -
c. Ancrage des cadhérines à l'actine ..... - 27 -

3. Rôles de la N-cadhérine au cours de la mise en place du système nerveux central ..... *- 29 -*

3.1. Mise en place du neuroépithélium ..... - 29 -
3.1.1. Mise en évidence du rôle des complexes adhésifs ..... - 29 -
3.1.2. La N-cadhérine dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des précurseurs neuronaux ..... - 31 -
3.2. Migration neuronale ..... - 32 -
3.3. Croissance neuritique ..... - 32 -

Chapitre II: Les Microtubules ..... - 35 -

1. Structure et assemblage des microtubules ..... *- 35 -*

1.1. Structure des microtubules ..... - 35 -
1.2. Assemblage des hétérodimères de tubuline α/β ..... - 36 -
1.3. Formation des protofilaments ..... - 37 -
1.4. La nucléation des microtubules ..... - 40 -

2. Régulation de la dynamique des microtubules ..... *- 42 -*

2.1. Modifications post-traductionnelles des tubulines ..... - 42 -
2.1.1. La tyrosination, la détyrosination, la transformation Δ2 ..... - 42 -
2.1.2. L'acétylation ..... - 43 -
2.1.3. La polyglutamylation et la polyglycylation ..... - 44 -

2.2. Les protéines associées aux microtubules - 45 -
2.2.1. Protéines régulant la polymérisation des microtubules - 46 -
2.2.2. Protéines entraînant la dépolymérisation des microtubules - 46 -
2.2.3. Protéines de fragmentation des microtubules - 47 -
2.2.4. Les protéines stabilisatrices des microtubules - 47 -
a. Les MAP classiques - 47 -
b. Les protéines STOP - 48 -
c. La doublecortine - 48 -
d. Les protéines associées aux extrémités (-) des microtubules - 49 -
e. Les protéines associées aux extrémités (+) des microtubules - 50 -

Chapitre III: Relations cadhérines – microtubules - 58 -

1. Impacts des contacts cadhérines-dépendants sur l'organisation et la dynamique des microtubules - 58 -

1.1. Régulation de la dynamique des microtubules - 58 -
1.2. Recrutement des microtubules au niveau des contacts intercellulaires - 59 -

2. Capture de l'extrémité des microtubules - 61 -

2.1. Capture des extrémités (+) des microtubules - 61 -
2.2. Capture des extrémités (-) des microtubules - 63 -

3. Impact des microtubules sur la formation et la stabilité des contacts - 66 -

3.1. Les microtubules régulent de façon positive les cadhérines aux contacts intercellulaires - 66 -
3.2. Les microtubules régulent de façon négative les cadhérines aux contacts intercellulaires - 67 -

4. Les RhoGTPases : actrices dans la relation cadhérines-microtubules - 70 -

4.1. Les RhoGTPases influencent le cytosquelette de microtubules - 70 -
4.2. Les microtubules influencent les RhoGTPases - 72 -

5. Interactions fonctionnelles entre microtubules et actine - 73 -

5.1. Neuritogenèse - 74 -
5.2. Croissance axonale - 76 -

RESULTATS - 81 -

Présentation des travaux - 81 -

1ère partie (article en préparation) : Influence de la N-cadhérine sur la dynamique et le recrutement des microtubules au cours de la formation de contacts stables - 85 -

1. Abstract - 87 -

2. Introduction - 88 -

3. Experimental procedures - 90 -

4. Results - 93 -

5. Discussion - 112 -

6. Acknowledgement - 115 -

7. References - 116 -

2ème partie: Influence de la N-cadhérine sur les microtubules au cours de la croissance neuritique - 121 -

1. Matériels et méthodes - 121 -

2. Résultats -discussion - 124 -

2.1. Comportement des neurones d'hippocampe après activation de la N-cadhérine - 124 -
2.1.1. La N-cadhérine stimule très précocement la croissance neuritique - 124 -
2.1.2. L'engagement de la N-cadhérine modifie la morphologie des cônes de croissance - 125 -
2.1.3. La N-cadhérine stimule la motilité des corps cellulaires - 126 -
2.2. Influence de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules - 128 -
2.2.1. La N-cadhérine stimule la dynamique des microtubules - 128 -
2.2.2. Régulation de la dynamique des microtubules par l'α-caténine - 129 -
2.3. Rôle de la N-cadhérine au cours de la neuritogenèse - 130 -

Travail annexe (article publié) : La N-cadhérine favorise la survie neuronale via l'inhibition de Bim..... - 135 -

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... - 139 -

1. Mécanismes régulant le recrutement des microtubules par les cadhérines..... - 139 -

1.1. Distribution des microtubules dans les zones d'adhésion dépendantes de la N-cadhérine..... - 139 -
1.2. Impact de la polarité dans le recrutement des microtubules au niveau des zones d'adhésion..... - 142 -
1.3. Modèles moléculaires entre les microtubules et les complexes cadhérines/caténines..... - 143 -
1.4. Rôle du recrutement des microtubules au cours de l'apoptose..... - 144 -

2. Régulation de la dynamique des microtubules par les contacts N-cadhérine..... - 145 -

2.1. Spécificité de l'influence de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules..... - 146 -
2.2. Implication du cytosquelette d'actine..... - 146 -

3. Impact du cytosquelette de microtubules sur les adhésions dépendantes des cadhérines..... - 148 -

4. Conclusion générale..... - 149 -

Bibliographie ..... - 153 -

Figures

Introduction

Figure 1 | Les différents types de jonction au sein d'un épithélium. ..... - 5 -
Figure 2 | Modes de migration cellulaire. ..... - 7 -
Figure 3 | Schéma de la structure des membres de la superfamille des cadhérines. ..... - 10 -
Figure 4 | Structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire des cadhérines E et N. ..... - 11 -
Figure 8 | Rôles de la caténine p120 dans le maintien des cadhérines à la membrane plasmique. ..... - 17 -
Figure 9 | La petite GTPase Rap1 régule les niveaux membranaires de N-cadhérine. ..... - 18 -
Figure 10 | Le domaine EC1 est responsable de l'interaction en *trans* des cadhérines. ..... - 20 -
Figure 11 | Modèle de mécanisme de formation d'un dimère *trans*. ..... - 21 -
Figure 12 | Interactions *cis* et *trans* au cours de l'engagement des cadhérines dans un contact. ..... - 22 -
Figure 13 | Polymérisation et organisation du cytosquelette d'actine. ..... - 24 -
Figure 14 | Modèle d'association des cadhérines à l'actine proposé par Nelson. ..... - 26 -
Figure 15 | Les interactions *trans* effectuées par les cadhérines déclenchent des voies de signalisation permettant le remodelage du cytosquelette d'actine. ..... - 28 -
Figure 16 | La N-cadhérine est nécessaire au cours de la formation du cortex cérébral. ..... - 30 -
Figure 17 | Stimulation de la croissance neuritique par la N-cadhérine : ancrage à l'actine et signalisation FGF. ..... - 33 -
Figure 18 | Structure et assemblage des tubulines α et β. ..... - 36 -
Figure 19 | Voies de repliement des tubulines α et β. ..... - 37 -
Figure 20 | Mécanismes de polymérisation/dépolymérisation des microtubules. ..... - 39 -
Figure 22 | Les différentes modifications post-traductionnelles des tubulines et leur localisation. ..... - 44 -
Figure 23 | Les différentes protéines associées aux microtubules. ..... - 45 -
Figure 24 | Mise en évidence du rôle protecteur de la patronine. ..... - 50 -
Figure 25 | Structure des protéines CAP-Gly. ..... - 51 -
Figure 26 | L'inhibition des protéines CLIP perturbe la formation de l'axone. ..... - 52 -
Figure 27 | Structure des protéines CLASP. ..... - 53 -
Figure 28 | Structure de la protéine APC et fonction dans le développement du cortex cérébral. ..... - 54 -
Figure 29 | Structure et fonction des protéines EB. ..... - 56 -
Figure 30 | Les contacts dépendants des cadhérines stabilisent les extrémités (+) des microtubules. ..... - 59 -
Figure 31 | Les contacts dépendants des cadhérines recrutent les microtubules dans les cellules épithéliales. ..... - 60 -
Figure 32 | Représentation graphique des différents modèles moléculaires de capture de l'extrémité des bouts (+) des microtubules par les cadhérines. ..... - 63 -
Figure 33 | Modèles moléculaires de capture de l'extrémité des bouts (-) de microtubules non centrosomaux dans les cellules épithéliales. ..... - 65 -
Figure 34 | L'intégrité des microtubules est nécessaire à l'accumulation des cadhérines lors de la formation des contacts dans les cellules MCF-7. ..... - 67 -
Figure 35 | La dépolymérisation des microtubules atténue le désassemblage des contacts. ..... - 68 -
Figure 36 | Cycle de régulation des Rho GTPases. ..... - 70 -
Figure 37 | Modes d'action des Rho GTPases sur la régulation des microtubules. ..... - 71 -

Figure 38 | Les différents stades de la morphogenèse neuronale. ..... - 73 -
Figure 39 | Les microtubules sont nécessaires pour le développement neuronal. ..... - 75 -
Figure 40 | Interaction moléculaire entre les microtubules et l'actine. ..... - 76 -

Résultats

Première partie

Figure 1 | MTs are directed toward cell-cell contacts in C2 cells but maintained at distance by cadherin engagement. ..... - 94 -
Figure S1 | Distribution of MT +TIPs in C2 cells spread on Ncad-Fc. ..... - 96 -
Figure S2 | Characterization of MTs in C2 cells spread on Ncad-Fc. ..... - 96 -
Figure 2 | EB3 comet persistence and MT mean elongation rate are negatively regulated by cadherin engagement. ..... - 98 -
Figure 3 | Cytochalasin but not blebbistatin treatment alleviates the negative effect of N-cadherin engagement on MT +ends dynamics. ..... - 101 -
Figure 4 | N-cadherin engagement stimulates the actin retrograde flow. ..... - 103 -
Figure S3 | Effect of the expression of DN-Ncad mutant on MT penetration. ..... - 104 -
Figure 5 | An acto-myosin belt is responsible for the inhibition of MT recruitment in cadherin adhesions ..... - 107 -
Figure S4 | Relative distribution of MTs, cadherin adhesions and actin ..... - 108 -
Figure S5 | Effect of Cytochalasin D and blebbistatin on F-actin and MT organization ..... - 109 -
Figure 6 | Taxol treatment stabilizes N-cadherin adhesions. ..... - 111 -

Deuxième partie

Figure 41 | La N-cadhérine stimule la croissance neuritique dès les premiers stades de la morphogenèse neuronale. ..... - 124 -
Figure 42 | La surface des cônes de croissance diminue lorsque les neurones établissent des contacts dépendants de la N-cadhérine. ..... - 125 -
Figure 43 | L'engagement de la N-cadhérine stimule la motilité du corps cellulaire des neurones. ..... - 127 -
Figure 44 | La dynamique des microtubules est stimulée par l'engagement de la N-cadhérine. ..... - 129 -
Figure 45 | L'α-caténine influence la dynamique des microtubules. ..... - 130 -
Figure 46 | Electroporation *in utero* du mutant N-cadhérine et étalement sur substrat Ncad-Fc. - 131 -

Discussion et perspectives

Figure 47 | Distribution des protéines des bouts (+) EB3 dans une zone proche des membranes de cellules C2C12 étalées sur substrats de fibronectine ou de Ncad-Fc. ..... - 141 -
Figure 48 | La protéine CLIP-115-GFP est co-immunoprécipitée par la β-caténine. ..... - 144 -
Figure 49 | Le cytosquelette d'actine et de microtubules ainsi que l'endocytose ne modifient pas la quantité totale de N-cadhérine. ..... - 148 -

Tableaux

Tableau 1 | Membres de la superfamille des cadhérines. ..... - 9 -
Tableau 2 | Protéines associées à l'actine régulant la structure et la dynamique de l'actine. ..... - 25 -
Tableau 3 | Impacts de la perturbation des microtubules sur les contacts dépendants des cadhérines..... - 69 -

Liste des abréviations

ADF/cofiline	Actin depolymerizing factor/cofiline
ADP	Adénosine Diphosphate
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARD1-NAT1	arrest-defective 1-amino-terminal α-amino acetyl tranferase 1
Arp2/3	Actin related protein 2/3
ARPC	Arp complex component
ATP	Adénosine Triphosphate
αTAT1	α tubulin N-acetyl transferase 1
CAM	Cell adhesion molecule
CAP-Gly	Cytoskeleton-associated proteins glycin-rich
CBD	Catenin-binding domain
Cdf	Cerebellar deficient folia
CHO	Chinese Hamster Ovary
CCT	Chaperonin containing TCP-1
CKII	Casein kinase II
CLASP	CLIP associated protein
CLIP	cytoplasmic linker protein
CRMP2	Collapsin response mediator protein 2
Domaine EC	Domaine extracellulaire
ELP	Elongator protein complex
Ena/VASP	Enabled/Vasodilator-stimulated phophoprotein
EB	End binding
EPLIN	Epithelial protein lost in neoplasm
FGF	Fibroblast growth factor
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
γ-TuRC	γ-Tubulin ring complex
γ-TuSC	γ-Tubulin small complex
GCN5	general control of amino acid synthesis
GEF	Guanosine exchange factor
GMPCPP	guanylyl 5′-(b,g-methylenediphosphonate)
GPC 2-6	Gamma-tubuline protein complex 2-6
GPI	Glycophosphatidyl inositol
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3β
GST	Glutathione S transférase
HDAC6	histone deacetylase 6
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
JMD	juxta-membrane domain
MAP	Microtubule associated proteins
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCAK	mitotic centromere associated kinesin

MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
mDia	mammalian Diaphanous
MEC	matrice extracellulaire
MEF	mouse epithelial fibroblasts
MET	microscopie électronique en transmission
MT	microtubule(s)
MTOC	Microtubule organizing center
NES	Nuclear Export Sequence
NGF	Nerve growth factor
NHEK	Normal human epithelial kidney
NLS	Nuclear Localization Sequence
NPF	Nucleator promoting factor
PAK1	p21-activated kinase
PFD	Préfoldine
Pi	Phosphate inorganique
Pi3-kinase	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLEKHA7	Pleckstrin homoly domain-containing, family A, member 7
PtK2	Potorous tridactylis (potoroo or kangaroo rat) kidney
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RMN	résonance magnétique nucléaire
shRNA	short hairpin RNA
SIRT2	sirtuin2
Src	Sarc pour sarcome
STOP	Stable-Tubule-Only-Peptide
SVZ	Subventricular zone
TBC	Tubulin cofactor
TOG	Tumor overexpressed gene
TCF/LEF	T-cell-specific factor/LEF: lymphoid enhancer-binding factor
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TTL	Tubulin tyrosine ligase
TTLL	TTL-like
VH	Vinculin homology
WASP	Wiskott-Aldrich syndrom protein
YAP	Yes-associated protein
ZO	Zonula Occludens

Résumé

Les récepteurs d'adhésion de la famille des cadhérines participent aux interactions cellule-cellule, permettant de faire le lien entre la cellule adjacente et le cytosquelette. Elles recrutent intracellulairement les caténines α, β et p120. Le lien des cadhérines avec les microtubules a été peu étudié mais de récents travaux suggèrent un lien fonctionnel entre eux. Mon projet de thèse a visé à mieux comprendre la relation existant entre la N-cadhérine et les microtubules dans deux contextes particuliers : l'adhésion et la migration cellulaires.

J'ai étudié l'impact de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules au cours de la formation des contacts dépendants de la N-cadhérine dans les cellules C2C12 (lignée myogénique, souris). J'ai pu prouver que les adhésions N-cadhérine recrutaient les microtubules mais que ce recrutement était freiné par les microfilaments. En effet la formation d'arcs d'actine contractiles à l'arrière du lamellipode empêche les microtubules de pénétrer dans les zones d'adhésion. De plus la vitesse moyenne de progression de l'extrémité (+) des microtubules est diminuée, mais est restaurée grâce à l'expression d'un mutant N-cadhérine ainsi que par dépolymérisation de l'actine. Inversement la N-cadhérine stimule le flux rétrograde d'actine de manière dépendante de la myosine II. En retour la dépolymérisation des microtubules n'empêche pas la formation des adhésions cadhérines et la stabilisation des microtubules par des traitements au taxol entraîne même une accumulation des cadhérines aux contacts. La N-cadhérine et les microtubules établiraient donc dans ce contexte cellulaire une boucle de rétrocontrôle négatif. J'ai étudié ensuite la relation N-cadhérine/microtubules au cours de la migration cellulaire (modèle de neurones d'hippocampes). La N-cadhérine stimule la croissance neuritique et la motilité des corps cellulaires, et j'ai pu constater qu'elle augmentait également la vitesse moyenne de progression de l'extrémité (+) des microtubules. L'expression de mutants de la N-cadhérine et de l'α-caténine, qui inhibent la croissance neuritique, annulent également la stimulation de la vitesse moyenne de progression des microtubules. En conclusion les résultats obtenus indiquent un lien fonctionnel N-cadhérine/microtubules dépendant de l'actine et dont la nature est différente selon le contexte cellulaire. Mes travaux mettent donc à jour un nouveau lien impliqué dans la formation des contacts ainsi que dans la migration cellulaire. J'ai également participé à l'étude du rôle de la N-cadhérine dans le contrôle de la balance survie/apoptose. Nous avons montré que la N-cadhérine promeut la survie neuronale. L'engagement de la N-cadhérine active une voie de signalisation activant les kinases Mek1/2 menant à la phosphorylation et à la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bim.

Abstract

Adhesion receptors from the cadherin family participate to cell-cell interactions, allowing establishing a link between the adjacent cell and the cytoskeleton. Cadherins intracellularly recruit the α, β and p120 catenins. The relationship between cadherins and microtubules has been quite neglected but recent studies suggest a functional link between them. Indeed, cell-cell contacts would stabilize the microtubules and recruit them through interactions between β-catenin and microtubule extremity associated proteins. My thesis work focused on a better understanding of the existing relationship between N-cadherin and microtubules in two particular contexts: cell adhesion and migration.

I have studied the impact of N-cadherin cell engagement on the microtubule recruitment and dynamics during N-cadherin contact formation of C2C12 cells (mouse myogenic cell line). I showed that N-cadherin adhesions recruit microtubules, but this recruitment is restricted by microfilaments. Indeed the formation of contractile actin arcs at the rear of the lamellipodium prevents the microtubules to penetrate within adhesion areas. Moreover the mean speed of microtubule (+) extremity was decreased, but restored by N-cadherin mutant expression and by actin depolymerization. Reversely, N-cadherin adhesion stimulates the actin retrograde flow in a myosin II dependent manner. In turn microtubule depolymerisation does not prevent cadherin adhesion formation; and microtubule stabilization through taxol treatments led to the accumulation of cadherins at cell contacts. Thus N-cadherin and microtubules would establish in this cellular context a negative feedback loop. Next I have studied the N-cadherin/microtubules relationship during cell migration (hippocampal neuron model). N-cadherin stimulates neuritic growth and cell body motilities. I showed that N-cadherin was also stimulating microtubule (+) end mean speeds. N-cadherin and α-catenin mutant expression, inhibiting neurite outgrowth, cancelled also the mean speeds of microtubule progression. In conclusion, these results clearly reveal a functional link between N-cadherin and microtubules dependent of actin, whose nature is different depending on the cellular context. My work highlights a novel link involved in contact formation and cellular migration. I have also participated to the study of the role of N-cadherin during survival. We showed that N-cadherin promotes the neuronal survival by stimulating a signaling pathway activating the Mek1/2 kinases, leading to the phosphorylation and degradating of the pro-apoptotic protein Bim.

Introduction

INTRODUCTION

Tout organisme vivant pluricellulaire est issu de la fertilisation d'un œuf, donnant naissance à plusieurs cellules qui se sont associées et agencées entre elles pour former des tissus et des organes. Au cours du développement les cellules doivent pour cela migrer et adapter leur forme et leur cohésion aux contraintes et aux signaux locaux, générant une multitude de cellules avec des morphologies et fonctions différentes. De nombreuses étapes telles que la prolifération, la détermination du destin cellulaire, la migration, la différenciation dépendent de l'établissement des contacts physiques des cellules avec leur environnement. Les contacts cellulaires sont permis notamment grâce à des protéines, appelées molécules d'adhésion cellulaire (CAM : « Cell adhesion molecules ») résidant dans la membrane plasmique qui d'une part sont responsables de l'adhésion avec leur environnement, constitué par d'autres cellules ou de la matrice extracellulaire, et d'autre part qui s'associent à des partenaires cytoplasmiques. Ces CAM et leurs partenaires constituent ainsi des plateformes permettant l'adhésion et la transduction de signaux via leur domaine cytoplasmique. Les cadhérines sont des molécules d'adhésion intercellulaire appartenant à la grande famille des CAM.

Les molécules d'adhésion agissent en étroite coopération avec le cytosquelette composé des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules, tous trois essentiels au cours de la vie cellulaire. En effet le cytosquelette est un élément clé dans la régulation de la morphologie cellulaire, au cours de la division ou encore de la migration cellulaire. La relation des cadhérines avec l'actine dans l'établissement et le maintien des contacts a été largement étudiée, au détriment des microtubules dont l'importance commence seulement à susciter l'intérêt scientifique. Au cours de ma thèse je me suis penchée sur l'étude du rôle de la N-cadhérine, qui est très exprimée dans les muscles et le système nerveux, dans le recrutement et la dynamique des microtubules au cours de la formation de contacts intercellulaires stables et de la croissance neuritique.

Avant de présenter les résultats acquis au cours de ma thèse, je présenterai dans cette partie introductive dans un premier temps les récepteurs d'adhésion de la famille des cadhérines ainsi que leurs partenaires d'interaction. Je m'attacherai à décrire comment les contacts intercellulaires dépendants des cadhérines peuvent se former et être stabilisés mais aussi quels rôles ils peuvent jouer au cours du développement du système nerveux. Dans un deuxième temps je présenterai le réseau de microtubules, comment il se forme et de quelles manières sa dynamique peut être régulée. Enfin je terminerai par la présentation des relations cadhérines – microtubules connues à ce jour, comment les contacts dépendants des cadhérines peuvent recruter et réguler la dynamique des microtubules. J'aborderai également quelle influence les microtubules peuvent avoir en retour sur les contacts dépendants des cadhérines.

Chapitre I : Les Cadhérines

1. Les molécules d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) sont des glycoprotéines transmembranaires jouant un rôle très important au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Elles permettent l'établissement et le maintien de l'intégrité tissulaire mais sont également impliquées dans des processus migratoires. Les CAM interviennent dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Elles sont composées de quatre grandes familles regroupées selon leur structure : les immunoglobulines, les sélectines, les intégrines et les cadhérines.

La superfamille des immunoglobulines

Les CAM de la superfamille des immunoglobulines (ou IgCAM) sont des protéines très largement exprimées dans les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales, le système nerveux et les leucocytes. Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire composé d'un nombre variable de domaines de type immunoglobuline. Les interactions intercellulaires réalisées par les IgCAM sont indépendantes du calcium et de types homophilique et hétérophilique. Cependant les IgCAM ne possèdent pas toutes un rôle adhésif et peuvent notamment interagir avec d'autres récepteurs d'adhésion, les impliquant dans un grand nombre de processus tels que l'adhésion et la migration. Les IgCAM possèdent en général un domaine transmembranaire ou peuvent être attachées à la membrane plasmique par une ancre GPI (glycophosphatidyl inositol). Elles peuvent s'associer par leur domaine intracellulaire avec le cytosquelette d'actine ou des protéines associées à l'actine telles que l'ankyrine et la spectrine. (Bombardelli and Cavallaro, 2010; Cavallaro and Dejana, 2011).

Les sélectines

Les sélectines s'apparentent à la famille des lectines et possèdent un seul domaine transmembranaire. Elles effectuent des interactions hétérophiliques avec des glycans présentés par la surface des cellules et ces associations sont dépendantes du calcium. Les sélectines sont localisées à la surface des leucocytes (sélectine L), des plaquettes sanguines (sélectine P) et des cellules endothéliales des capillaires sanguins (sélectine E). L'adhésion réalisée par les sélectines est d'une force faible mais de haute affinité (Laubli and Borsig, 2010). Les sélectines jouent notamment un rôle dans l'adhésion des leucocytes aux parois vasculaires permettant leur extravasation et sont donc des protéines majeures au cours des réponses immunitaires innée et adaptative.

Les intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhésion largement exprimées dans l'organisme, comme par exemple dans le système nerveux, les cellules du système immunitaire ou encore

dans les cellules épithéliales. Ce sont des protéines transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β interagissant avec des protéines de la matrice extracellulaire. Il existe un très grand nombre de sous-unités différentes : 18 α et 8 β, s'assemblant en 24 hétérodimères et dont l'association diffère selon le type cellulaire. Ces sous-unités α et β sont composées d'un grand domaine extracellulaire et d'un petit domaine cytoplasmique.

Les intégrines peuvent interagir avec un très grand nombre de ligands, tels que des composants de la matrice extracellulaire (MEC, ensemble de macromolécules sécrétées par les cellules) comme par exemple la fibronectine et la vitronectine, des ligands solubles ou encore d'autres récepteurs d'adhésion comme la protéine V-CAM ou la E-cadhérine (Geiger et al., 2009; Niu and Chen, 2011). Les intégrines peuvent s'associer aux filaments intermédiaires mais la plupart des intégrines se lie au cytosquelette d'actine en recrutant des protéines telles que la taline, la vinculine et l'α-actinine (Margadant et al., 2011).

Les cadhérines

Les cadhérines - pour « calcium-dependent adhesion » - ont été identifiées à l'origine comme étant des molécules de la surface cellulaire responsables de l'adhésion cellule-cellule dépendante du calcium par Takeichi en 1977 (Takeichi, 1977). Les cadhérines sont des glycoprotéines principalement transmembranaires qui permettent les interactions cellule-cellule majoritairement par des liaisons de type homophiliques. Leur conformation fonctionnelle est dépendante de la liaison du calcium dans leur domaine extracellulaire et leur domaine cytoplasmique est associé à l'actine.

Les molécules d'adhésion cellulaire permettent de réaliser différents types de contacts variant selon le type et le contexte cellulaires. En effet, elles peuvent établir des jonctions au sein des épithélia qui sont des structures stables, mais les molécules d'adhésion sont également très importantes lors de la migration cellulaire. La régulation fine des phénomènes d'adhésion va ainsi permettre de réguler la balance entre l'établissement de contacts très stables et des contacts autorisant les phénomènes de migration.

1.1. Les jonctions cellulaires

Les jonctions cellulaires sont des structures spécialisées établissant un lien entre le cytosquelette et l'environnement, que ce soit des cellules adjacentes ou la MEC. Leur rôle principal est de maintenir la cohésion et la communication cellulaires. Il existe trois grands types de jonctions, classées selon leurs fonctions : les jonctions serrées (ou *tight junctions* ou *Zonula Occludens*), les jonctions communicantes (ou *communicating junctions* ou *jonctions gap*) et les jonctions d'ancrage (ou *anchoring junctions*). Ces différentes jonctions ont été initialement visualisées grâce au développement de la microscopie électronique, puis caractérisées par leur organisation ultrastructurale et moléculaire.

1.1.1. Les jonctions serrées

Le rôle principal des jonctions serrées est de sceller les cellules entre elles afin de réguler la perméabilité trans-épithéliale et de créer une barrière contre la diffusion de lipides et de protéines d'un domaine membranaire de la cellule à un autre (Steed et al., 2010). Par exemple dans le tissu épithélial les jonctions serrées sont situées au niveau apico-latéral (figure 1, A et B), elles séparent les compartiments apicaux et basolatéraux et empêchent la diffusion de protéines et lipides membranaires entre ces deux compartiments. Les composants principaux de ces jonctions sont les protéines transmembranaires **claudines** et **occludines** qui s'associent au niveau cytoplasmique au squelette d'actine via une interaction avec les protéines ZO-1 (Zonula Occludens-1), ZO-2 et ZO-3 (Bednarczyk and Lukasiuk, 2011).

1.1.2. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, ou jonctions « gap », forment des canaux entre cellules adjacentes. Ces canaux résultent de l'assemblage de 2 hémicanaux ou connexons provenant de deux cellules en contact, composés chacun de 6 sous-unités, les **connexines** (figure 1, A et C). Les jonctions « gap » permettent le passage de petits métabolites, de signaux chimiques et d'électrolytes entre cellules adjacentes attribuant ainsi à ces cellules une unité fonctionnelle. Un exemple frappant est le muscle cardiaque : un myocyte cardiaque isolé de ce tissu va garder la capacité de se contracter spontanément ou après stimulation électrique. Cependant le bon fonctionnement de cet organe nécessite une coordination entre tous les myocytes en réponse aux stimuli hormonaux et électriques. Cette coordination résulte du couplage électrique des myocytes adjacents dépendant des jonctions communicantes. Les jonctions communicantes participent également à la transmission de l'influx nerveux au sein des synapses électriques, grâce au passage d'ions d'un compartiment synaptique à un autre, entraînant une dépolymérisation membranaire (pour revue (Bloomfield and Volgyi, 2009)).

1.1.3. Les jonctions d'ancrage

La principale fonction des jonctions d'ancrage est de maintenir la cohésion des cellules entre elles en réponse au stress mécanique grâce à leur liaison au cytosquelette. Ces jonctions sont très abondantes dans des tissus soumis à un fort stress mécanique tels que le cœur et l'épiderme. Elles possèdent deux types de composants majeurs : des protéines d'ancrage intracellulaires qui connectent le complexe jonctionnel au cytosquelette et des protéines d'adhésion transmembranaires, interagissant au niveau de leur queue cytoplasmique avec les protéines d'ancrage et au niveau extracellulaire avec d'autres protéines d'adhésion. Les jonctions d'ancrage peuvent être classées en deux groupes selon la famille d'appartenance des protéines d'adhésion impliquées et le type de contact effectué :

- Les jonctions cellule-MEC, réalisées par la famille des **intégrines** et constituées des adhésions focales et des hémi-desmosomes (figure 1, A et D).

Les **adhésions focales** sont formées grâce à une interaction entre des protéines de la MEC et des récepteurs d'adhésion de la famille des intégrines, qui sont reliés via des protéines d'ancrage au squelette d'actine (Margadant et al., 2011). Cependant la famille des intégrines est composée de

plusieurs membres et certains peuvent être également des points d'ancrage aux filaments intermédiaires formant alors les **hémi-desmosomes** (Zhang and Labouesse, 2010).

- Les jonctions cellule-cellule, réalisées par des protéines appartenant à la famille des **cadhérines**, contenant les jonctions adhérentes et les desmosomes (figure 1, A et B).

Les **desmosomes**, formant des contacts ressemblant à des « boutons », sont composés de protéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines: les desmogléines et les desmocollines. Leur domaine intracellulaire est relié aux filaments intermédiaires via les protéines plakoglobines et desmoplakines (pour revue voir (Brooke et al., 2012)).

Les **jonctions adhérentes** sont quant à elles composées des cadhérines classiques (voir Introduction, Chapitre I paragraphe 2) reliées aux filaments d'actine par l'intermédiaire de complexes moléculaires contenant les différentes caténines, l'alpha-actinine et la vinculine (Baum and Georgiou, 2011). Selon le contexte tissulaire, les jonctions adhérentes vont adopter différentes morphologies, formant dans les épithélia des ceintures d'adhérence continues (appelées « *zonula adhaerens* »), ou des points d'attache ponctuels dans des cellules non épithéliales.

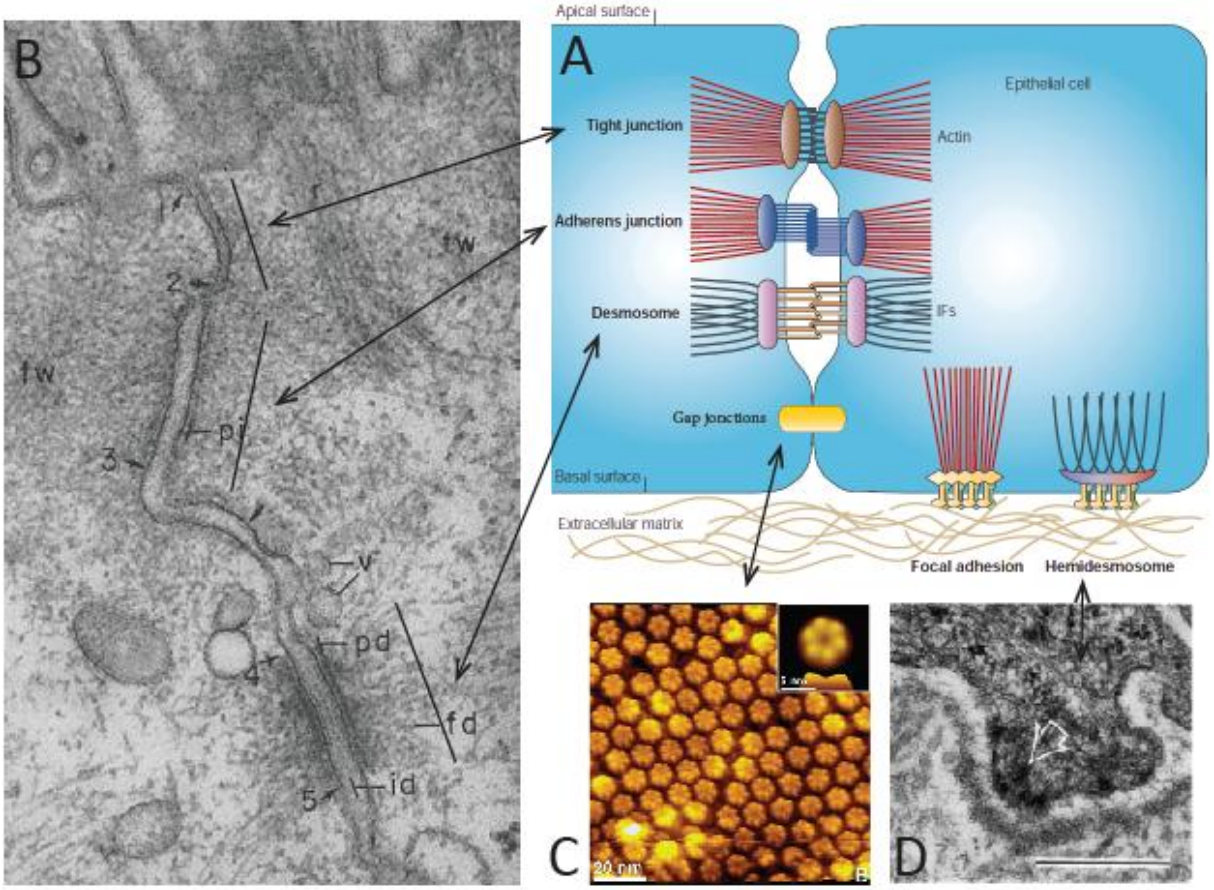


Figure 1 | **Les différents types de jonction au sein d'un épithélium.**
A : schéma adapté de (Jefferson et al., 2004). Les éléments du cytosquelette ancrés aux différentes jonctions sont représentés en rouge pour les filaments d'actine et en bleu pour les filaments intermédiaires. B : cliché de microscopie électronique en transmission (MET) d'épithélium d'intestin de rat, tiré de (Farquhar and Palade, 1963). C : image de microscopie à force atomique montrant la structure des composants des jonctions communicantes, encadré représentant un connexon avec ses six sous-unités, les connexines. Image tirée de (Sosinsky and Nicholson, 2005). D : cliché de MET révélant un hémi-desmosome, tiré de (McGrath et al., 1999).

1.2. La migration cellulaire

La migration cellulaire est essentielle au cours du développement ainsi que dans l'organisme adulte, et les molécules d'adhésion cellulaires y jouent un rôle majeur. En effet certaines cellules au sein de l'organisme ont besoin de migrer : que ce soit par l'extension de leur membrane afin d'atteindre et de contacter d'autres cellules ou par leur propre déplacement vers une autre zone de l'organisme afin d'accomplir leur fonction. Différents modes de migration cellulaire existent selon les types cellulaires : la migration amoeboïde et la migration mésenchymateuse (Friedl and Wolf, 2010) (pour les migrations multicellulaires voir également cette revue de Friedl).

La migration amoeboïde (figure 2 A) est basée sur la propulsion d'un bourgeonnement de la cellule (appelé « bleb » : décollement de la membrane du cortex et dont la formation est dépendante de la myosine II (Yoshida and Soldati, 2006)) ou de filopodes riches en actine au niveau du front de migration de la cellule. Ce type de migration nécessite peu des phénomènes d'adhésion et est utilisé notamment par des cellules du système immunitaire telles que les leucocytes (Lammermann et al., 2008).

La migration mésenchymateuse (figure 2 A) quant à elle requiert une adhésion cellulaire qui peut être relativement forte. Cette adhésion, qu'elle soit sur un substrat de MEC ou d'autres cellules, leur permet de générer des forces de protrusion afin de projeter leur membrane vers l'avant du front de migration, tandis que la membrane est rétractée à l'arrière de la cellule. Les fibroblastes ainsi que les cellules de la crête neurale vont pouvoir migrer via ce type de locomotion (Abercrombie et al., 1970; Ridley et al., 2003).

Comment les cellules réussissent-elles à transformer une force de traction exercée sur le substrat en un mouvement de la cellule vers l'avant ? Un modèle proposé est celui de « l'embrayage moléculaire » (Giannone et al., 2009; Mitchison and Kirschner, 1988; Thoumine, 2008), faisant une analogie avec le déplacement d'une voiture sur la route. Le moteur de la cellule serait l'actine, générant une force de propulsion grâce à sa polymérisation à l'avant de la membrane au niveau du front de migration et se dépolymérisant à l'arrière. L'action du moteur serait transmise par le système d'embrayage constitué des molécules adaptatrices se liant aux récepteurs d'adhésion représentant les « roues » se déplaçant sur la route, donc sur le substrat. L'avantage de ce modèle est qu'il est applicable pour différents types de récepteurs d'adhésion tels que les intégrines, les IgCAM et les cadhérines, comme proposé dans la revue de Grégory Giannone (figure 2B).

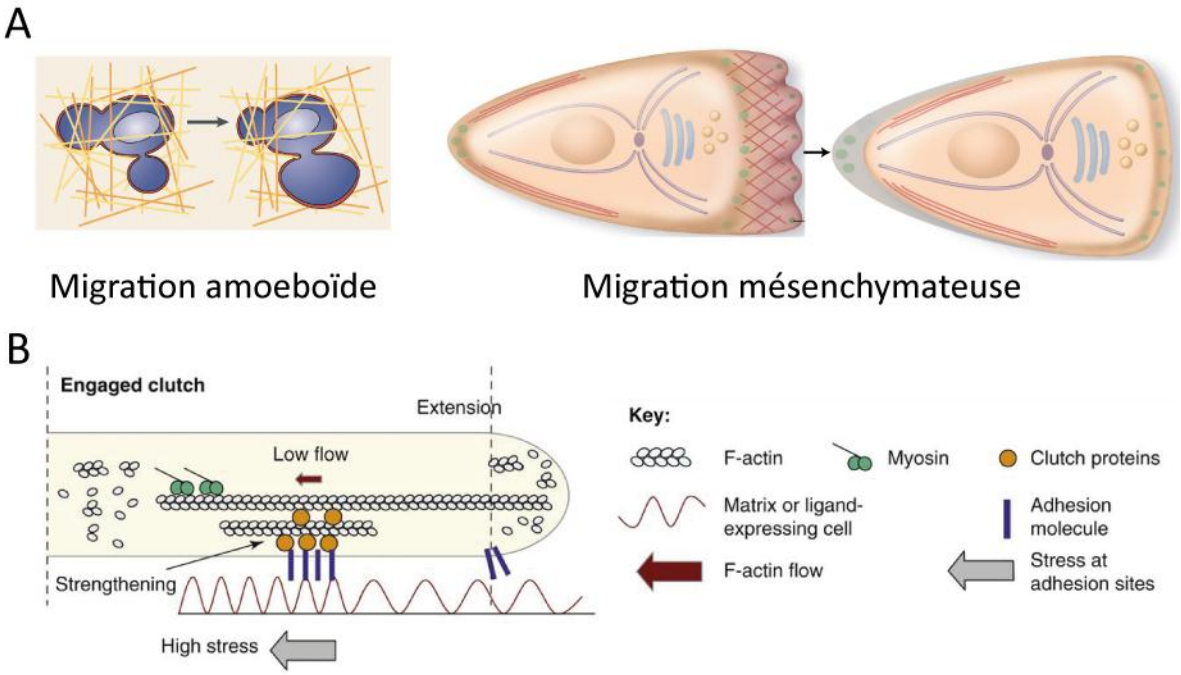


Figure 2 | **Modes de migration cellulaire.**
A : Représentations schématiques des migrations amoeboïde et mésenchymateuse. Les cellules se déplaçant par migration amoeboïde forment un bourgeon permettant ensuite de déplacer le matériel intracellulaire au niveau de ce décollement de la membrane. La migration mésenchymateuse est constituée de cycles de protrusion (au front de migration, cellule sur la gauche)/rétraction (arrière de la cellule, cellule sur la droite). Adapté de (Friedl and Wolf, 2003; Ridley et al., 2003).
B : Modèle de l'embrayage moléculaire. Un fort couplage entre le cytosquelette d'actine (le moteur) et les complexes d'adhésion (les roues) permet de générer une force de protrusion à l'avant du front de migration grâce à une polymérisation continue de l'actine au niveau de cette zone. De (Giannone et al., 2009).

Les récepteurs d'adhésion vont permettre, grâce à leur liaison avec le cytosquelette et leur environnement, de réguler les processus de motilité et d'adhésion nécessaires au développement et au fonctionnement de l'organisme. Ces processus sont finement régulés et leur dysfonctionnement peut avoir des conséquences graves, engendrant des malformations ou encore le développement cancéreux.

2. Les contacts intercellulaires dépendants des cadhérines

Les cadhérines sont des déterminants clé de la morphogenèse et de l'architecture tissulaire grâce à leur fonction « d'adhésif » intercellulaire. Les cadhérines sont des pionnières dans la formation des contacts intercellulaires car elles sont nécessaires à la mise en place des autres types de jonction chez les vertébrés (Gumbiner et al., 1988; Mege et al., 1988). En effet l'inhibition de la N-cadhérine (cadhérine classique, voir paragraphe 2.1. du chapitre I) par des anticorps ou des peptides bloquant son interaction entraîne des problèmes d'assemblage des jonctions gap (Shaw et al., 2007). La délétion spécifique de la N-cadhérine dans le tissu cardiaque de souris mutantes provoque une perte des disques intercalaires, une altération des jonctions communicantes, une diminution de la conduction et finalement la mort de l'animal

deux mois après l'induction de la délétion (Kostetskii et al., 2005; Li et al., 2005a). De manière identique, la formation des jonctions adhérentes dans les épithélia précède celle des jonctions serrées. Dans les étapes précoces de la formation des complexes jonctionnels, la protéine ZO-1, partenaire intracellulaire des jonctions serrées, est tout d'abord recrutée aux jonctions adhérentes puis est redistribuée afin de recruter les claudines et occludines (Itoh et al., 1997). Par ailleurs la délétion de la E-cadhérine dans l'épiderme de souris induit une mauvaise localisation des composants des jonctions serrées et augmente leur perméabilité, débouchant sur la mort du nouveau-né par déshydratation (Tunggal et al., 2005).

Les jonctions adhérentes sont donc des éléments essentiels dans les étapes précoces de la formation des complexes jonctionnels. Cependant les cadhérines ne sont pas uniquement localisées dans des jonctions intercellulaires, elles peuvent induire et maintenir les polarités cellulaire, coordonner les mouvements cellulaires.

Dans cette partie nous verrons comment les cadhérines établissent des contacts moléculaires entre elles et quels sont leurs partenaires. J'aborderai ensuite les rôles de la N-cadhérine, protéine que j'ai étudiée pendant ma thèse, au cours de la formation des contacts stables et de la migration cellulaire, notamment pendant la mise en place du système nerveux central.

2.1. Structure des cadhérines

Aujourd'hui la superfamille des cadhérines est constituée de plus de 100 membres. Elle est divisée en plusieurs sous-familles, définies selon la structure primaire de leurs membres. De manière générale les cadhérines sont constituées d'un domaine extracellulaire permettant l'adhésion intercellulaire, en général d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire qui lie le cytosquelette via différents partenaires. Une liste non exhaustive des différentes sous-familles ainsi que leurs caractéristiques générales sont répertoriées dans le tableau 1 (représentation schématique en figure 3).

	Sous-familles	Exemples	Domaines EC	Caratéristiques générales
Cadhérines classiques	Type I (domaine HAV)	E-, N-, R- cadh	5	Interactions homophiliques (quelques cas de liaisons hétérophiliques) Liaison aux caténines et à l'actine
	Type II (pas de HAV)	VE-, OB-cadh	5	
	Invertébrés	DE-, DN-cadh	8, 18	
Cadhérines non classiques	Cadhérines desmosomales	Desmocollines 1-3 Desmogléines 1-3	4 EC et un domaine d'ancrage	Desmosomes Liaisons homo, hétérophiliques Liaison aux filaments intermédiaires
	Cadhérines atypiques	T-cadh	5	Pas de domaine intracellulaire : ancre GPI Pas de liaison aux caténines ou à l'actine
		LI-cadh	7	Court domaine intracellulaire Pas de liaison aux caténines ou à l'actine
	Protocadhérines	α-, β-, γ-Pcdhs	6	Pas de liaison aux caténines mais à des kinases (ex : kinase Fyn)
	Cadherin-related signalling protein	FAT	34	Interaction hétérotypique
		Daschous	27	
		Flamingo	9	7 passages transmembranaires Pas de liaison à l'actine

Tableau 1 | Membres de la superfamille des cadhérines.
Cadh : cadhérine(s). Pcdhs : protocadhérines. Domaines EC : nombre de domaines extracellulaires. Pour revues : (Delva et al., 2009; Gumbiner, 2005; Hirano and Takeichi, 2012; Nollet et al., 2000; Tepass et al., 2000).

Nous traiterons ici uniquement des **cadhérines classiques**, qui sont séparées en trois groupes : les types I et II, répertoriés uniquement chez les vertébrés et les ascidies ; et le dernier groupe contenant les cadhérines d'invertébrés.

Les deux groupes I et II comprennent :

- Cadhérines de types I : les cadhérines 1 à 4 et la 15 (ou respectivement E pour épithélial, N pour neuronal, P pour placentaire, R pour rétinienne et M pour musculaire)
- Cadhérines de types II : les cadhérines 5 à 12 (pour exemple la cadhérine 5 est la VE-cadhérine pour vascular endothelium, la cadhérine 11 est la OB-cadhérine pour ostéoblaste)

Les différences entre les cadhérines de types I et II reposent sur les divergences des séquences primaires, la structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires et sur leur capacité à induire une adhésion intercellulaire, plus faible pour les cadhérines de type II (Nollet et al., 2000). Les interactions entre les cadhérines sont majoritairement de type homophilique pour le groupe I tandis que celles du groupe II peuvent également s'associer de manière hétérophilique. A partir de maintenant nous traiterons uniquement des **cadhérines classiques de type I** avec quelques références aux cadhérines classiques de type II, le terme « cadhérines » faisant donc référence aux « cadhérines classiques ».

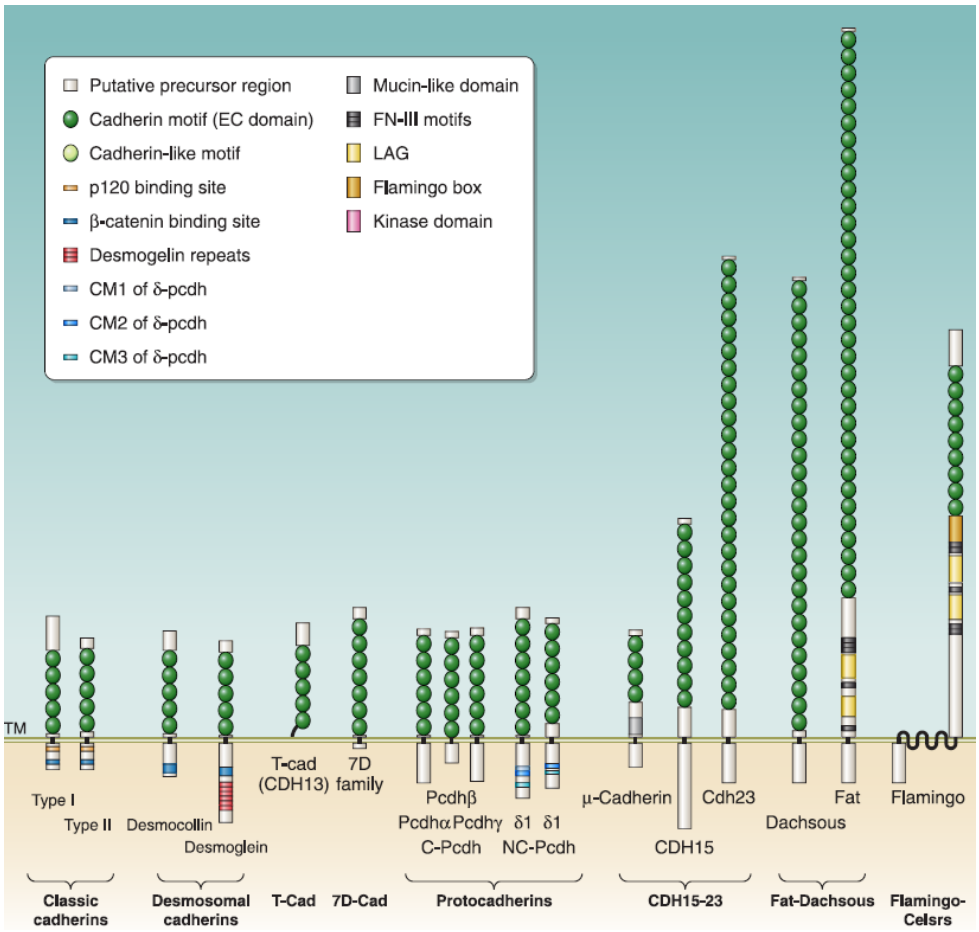


Figure 3 | **Schéma de la structure des membres de la superfamille des cadhérines.**
Représentation non exhaustive des différents membres des cadhérines. L'hétérogénéité entre les sous-familles se situe au niveau de leur structure (grande variété de nombre de domaines EC, domaine intracellulaire plus ou moins important) ainsi que dans la manière de relayer le signal provenant de l'extérieur au compartiment intracellulaire (ancrage au cytosquelette d'actine ou aux filaments intermédiaires, liaison avec des protéines telles que les caténines ou avec des kinases). Les cadhérines sont synthétisées et adressées à la membrane sous forme de précurseurs, avec la présence d'un pro-domaine à l'extrémité du domaine N-terminal qui est par la suite clivé. Schéma adapté de (Hirano and Takeichi, 2012).

Le domaine extracellulaire des cadhérines est composé de répétitions en tandem de séquences primaires appelées « domaines cadhérine » ou **domaines** « **EC** » (pour Extra Cellulaire) constitués d'environ 110 acides aminés. Les cadhérines classiques possèdent 5 domaines EC tandis que les autres membres de la superfamille en comptent très souvent un nombre supérieur (jusqu'à 34 domaines EC notamment pour la protéine FAT). Ces domaines sont numérotés de 1 à 5, le domaine EC1 étant le plus distal et EC5 le plus proche de la membrane plasmique. Les premières structures à avoir été établies sont celles du domaine EC1 des cadhérines de type I, la E- (Overduin et al., 1995) et la N-cadhérine (Shapiro et al., 1995) en 1995, par des méthodes de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de diffraction aux rayons X respectivement. Cependant les domaines EC1 à 5 possèdent des structures tridimensionnelles très similaires comme il a été montré pour la C-cadhérine, la E-cadhérine et la N-cadhérine (Boggon et al., 2002; Harrison et al., 2011) (figure 4). Les domaines EC sont structurés en sept brins β anti-parallèles qui sont assemblés en deux feuillets β (pour EC1 voir figure 10 A) (Overduin et al., 1995). L'association de trois ions calcium entre chaque domaine EC (entre EC1-

EC2, EC2-EC3, EC3-EC4 et EC4-EC5 : total de 12 ions calcium) apporte la rigidité de l'ectodomaine et le protège aussi de la protéolyse. En présence d'ions Ca^{2+}, la partie extracellulaire des cadhérines adopte une conformation courbée avec EC1 perpendiculaire à EC5 (Brasch et al., 2012; Niessen et al., 2011)).

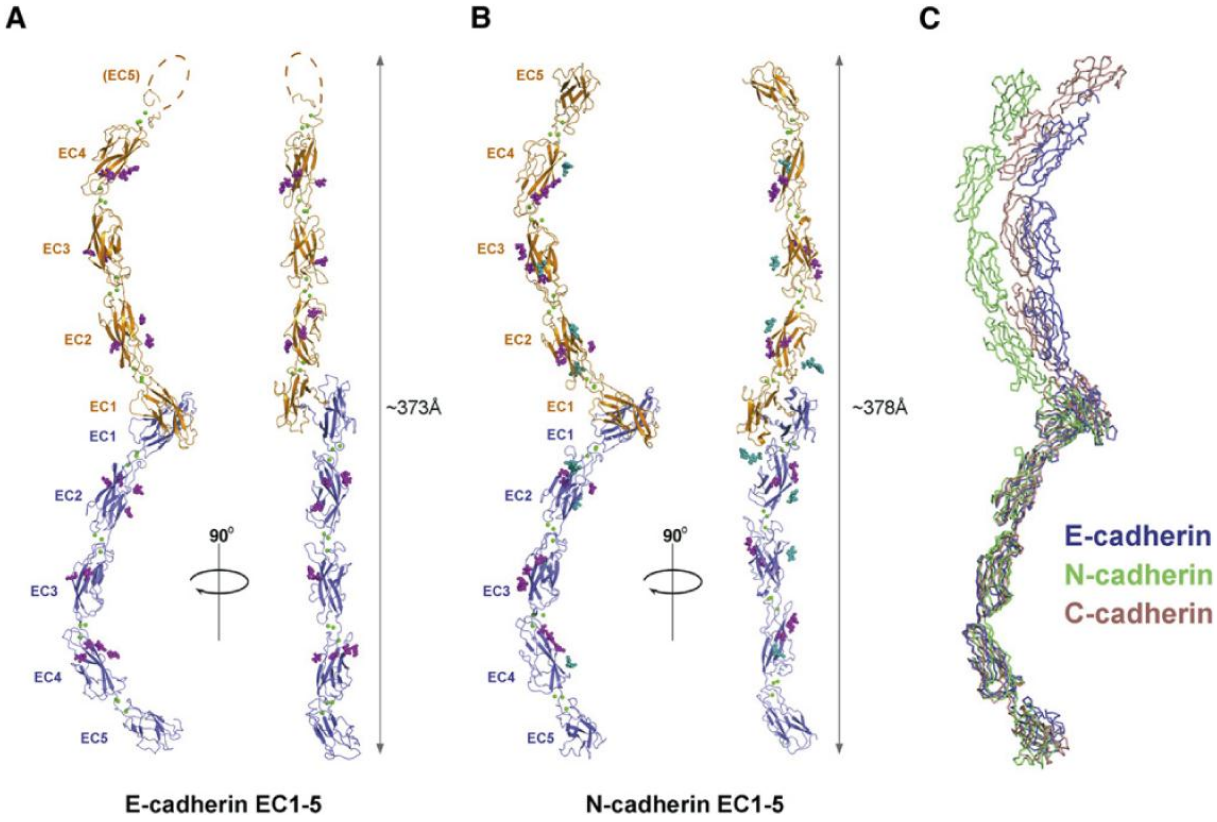


Figure 4 | Structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire des cadhérines E et N.
A et B : Représentation en ruban de la structure cristallographique des ectodomaines des cadhérines E (A) et N (B) interagissant en *trans*. Les protomères sont en bleu et orange, les ions calcium se liant entre chaque domaine EC sont représentés par des sphères vertes.
C : Structure des dimères *trans* des cadhérines E (bleu), N (vert) et C (marron) qui sont superposés par rapport à un seul protomère, permettant d'observer la différence de courbure de ces différents dimères. D'après (Harrison et al., 2011).

Le domaine intracellulaire des cadhérines est très conservé et leur permet d'interagir avec différents partenaires cytosoliques dont les principaux et mieux caractérisés sont les **caténines** (de *catena* : « chaîne » en latin). Ces caténines sont soit des protéines de la **famille Armadillo** (la β-caténine (Bienz, 2005; Gavard and Mege, 2005), la γ-caténine, les protéines de la famille de la caténine p120 (Carnahan et al., 2010)), soit des protéines de la **famille de la vinculine** (la vinculine (Carisey and Ballestrem, 2011) et l'α-caténine (Maiden and Hardin, 2011)). Les protéines de la famille des caténines p120 et les caténines β et γ interagissent directement avec des régions conservées du domaine cytoplasmique des cadhérines. Les caténines p120 se lient au domaine JMD (« juxta membrane domain ») tandis que les caténines β et γ s'associent au domaine CBD (« catenin-binding domain ») qui est à l'extrémité de la queue cytoplasmique des cadhérines. L'ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine est réalisé par l'intermédiaire de l'α-caténine qui est capable de lier la β-caténine. L'α-caténine est également capable d'interagir

avec la vinculine et de nombreuses autres protéines pouvant s'associer avec l'actine telles que par exemple l' α-actinine, ZO-1, EPLIN (Epithelial protein lost in neoplasm) ou encore la formine (Baum and Georgiou, 2011).

2.2. Les caténines, partenaires intracellulaires des cadhérines

2.2.1. La caténine p120

Cette protéine, initialement découverte comme substrat de phosphorylation de la kinase Src (Sarc) (Kanner et al., 1990; Reynolds and Roczniak-Ferguson, 2004), est exprimée sous différents isoformes (Carnahan et al., 2010; Ishiyama et al., 2010). L'**extrémité N terminale** de la protéine peut comporter selon les isoformes un domaine coiled-coil, mais elle contient également des sites de liaison pour la Rho GTPase RhoA, la tyrosine kinase Fer et PLEKHA7 (Plekstrin homoly domain-containing, family A, member 7) (figure 5B). La caténine p120 interagit spécifiquement avec le domaine JMD des cadhérines grâce à son **domaine central** composé de 9 répétitions Armadillo, composés chacun de trois hélices α (Ishiyama et al., 2010; Shapiro and Weis, 2009). La structure enroulée du domaine central lui confère une forme en « arche ». L'**extrémité C terminale** quant à elle est relativement non structurée.

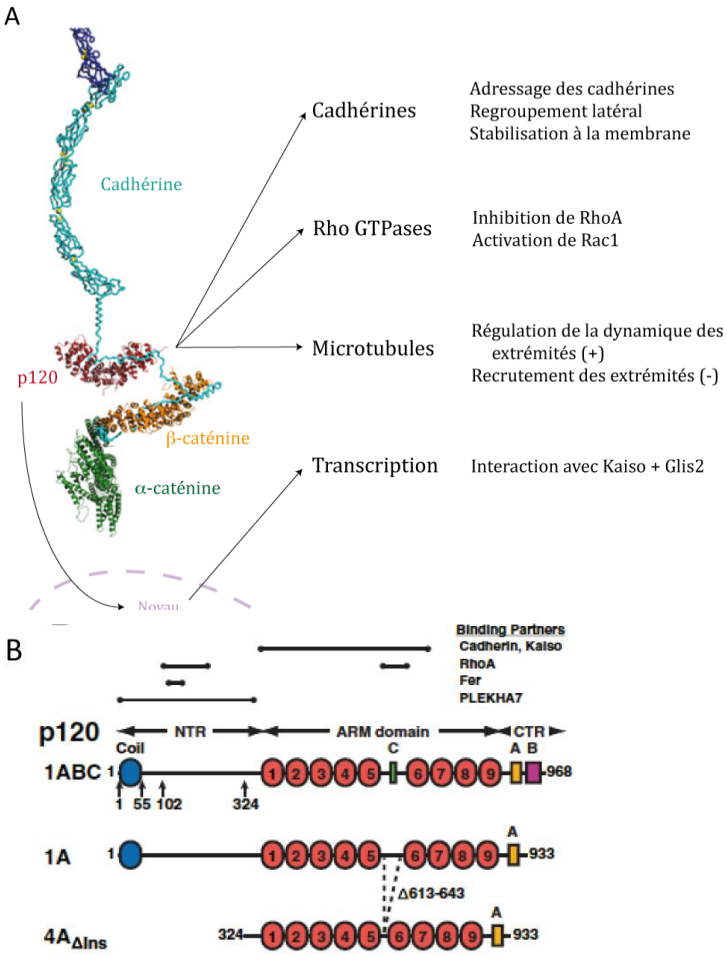


Figure 5 | La caténine p120 : domaine de liaison des cadhérines, structure et fonctions de la caténine.
A : Représentation de la structure du complexe cadhérine/caténines et récapitulatif des différentes foncions exercées par la caténine p120. **B :** Schéma de la structure de différents isoformes de p120 : 1ABC, 1A et $4A_{\Delta Ins}$. Les 4 départs de transcription sont indiqués en dessous de 1ABC (1, 55, 102, 324). Les domaines coiled-coil sont représentés par un cercle bleu, les répétitions Armadillo par des cercles rouges, et les exons A, B et C par des rectangles de couleur. Les domaines de liaison aux partenaires de p120 sont représentés au-dessus de 1ABC. NTR : région N terminale, ARM domain : domaine Armadillo, CTR : région C terminale. Adapté de (Ishiyama et al., 2010).

La caténine p120 permet l'adressage des cadhérines à la membrane et nécessiterait pour cela son domaine carboxy-terminal (Liu et al., 2007). Elle est impliquée dans la stabilisation des cadhérines engagées, favorisant ainsi le renforcement des contacts (voir paragraphe 2.4. du chapitre I). La liaison de p120 avec RhoA, Rho GTPase impliquée dans la régulation de la structure du réseau d'actine, inhibe l'échange du GDP/GTP de RhoA (Anastasiadis, 2007; Castano et al., 2007). Cette caténine ne joue pas uniquement un rôle au niveau des adhésions cadhérine-dépendantes mais elle régule également la transcription. p120 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) située dans le domaine Armadillo et deux d'export nucléaire (NES), l'une située dans le domaine Armadillo et l'autre dans le domaine C terminal (pour revue (Daniel, 2007)). Elle régule la transcription de gènes par exemple en réponse à l'activation de la voie de signalisation Wnt en déplaçant le répresseur de transcription Kaiso (Hong et al., 2012; Jiang et al., 2012) ou en s'associant à un autre répresseur de transcription Glis2 (Hosking et al., 2007) (figure 5A).

2.2.2. La β-caténine

La β-caténine est une protéine d'environ 90 kDa s'associant à la région C terminale des cadhérines. Elle a été découverte grâce à ses propriétés de co-immunoprécipitation avec la E-cadhérine (Nagafuchi and Takeichi, 1989; Ozawa et al., 1989). La β-caténine permet le lien cadhérine – actine en interagissant avec l'α-caténine. La β-caténine est constituée de 3 domaines structuraux (pour revue (Xing et al., 2008)) (figure 6). Son **extrémité N-terminale** est le site de liaison de l'α-caténine et contient des tyrosines phosphorylables par les protéines GSK-3β (Glycogen synthase kinase-3β) et CKII (Casein kinase II). Le **domaine central** de la β-caténine est composé de 12 répétitions Armadillo en tandem. Cette région très conservée constitue la zone d'interaction avec les cadhérines, les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (TCF : T-cell-specific factor/LEF : lymphoid enhancer-binding factor) et la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli, intervenant dans la voie de signalisation Wnt). L'**extrémité C-terminale** permet d'augmenter l'affinité de liaison de la β-caténine avec des facteurs de transcription. Les deux extrémités sont relativement flexibles à l'inverse du domaine Armadillo qui est rigide.

La liaison de la β-caténine aux éléments du complexe adhésif est régulée par des modifications post-traductionnelles ou par l'interaction avec d'autres protéines. Son lien avec les cadhérines va être modifié selon l'état de phosphorylation de ses tyrosines et sérines : par exemple la phosphorylation du résidu Y654 par la kinase Src perturbe l'interaction cadhérine – β-caténine tandis que celle de différentes sérines (684, 686 ,692) par la GSK-3β et CKII la renforce (Huber and Weis, 2001; Lilien and Balsamo, 2005). Un autre facteur de régulation est la protéine IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1), qui lorsque Rac1 et Cdc42 sont désactivées, se dissocie de ces Rho GTPases et interagit avec la β-caténine. Cette association IQGAP1 - β-caténine a été montrée comme déstabilisatrice des jonctions adhérentes (Fukata et al., 2001; Krishnan et al., 2012). A noter que l'étude réalisée par Hage et collaborateurs expose un effet opposé de la protéine IQGAP1 sur les contacts effectués par la E-cadhérine, mettant en évidence des mécanismes d'action différents selon les modèles d'étude utilisés (Hage et al., 2009).

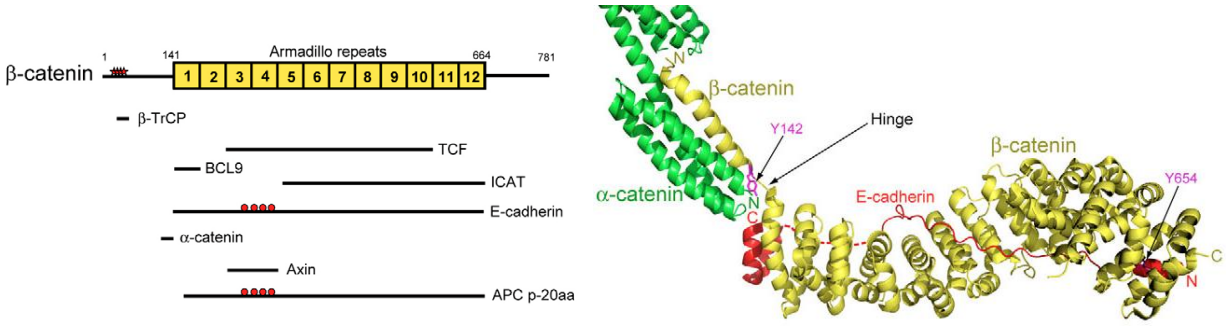


Figure 6 | La β-caténine : structure et sites de liaison à ses partenaires.

A : Représentation schématique de la β-caténine et des domaines de liaison à ses différents partenaires (représentés par les traits noirs en-dessous de la protéine). Les étoiles rouges en N-terminal de la β-caténine représentent les sites de phosphorylation de la caténine par CKI et la GSK-3β. Les points rouges indiquent les sites de la β-caténine qui lient les résidus phosphorylés de la E-cadhérine et de la protéine APC. **B :** Structure cristalline de la β-caténine complexée avec l'α-caténine (en vert) et la E-cadhérine (en rouge). Ne sont représentés que les parties associées de l'α-caténine et la E-cadhérine. Les résidus tyrosines de la β-caténine pouvant être phosphorylés et ainsi moduler son interaction avec l'α-caténine et la E-cadhérine sont en violet. D'après (Xu and Kimelman, 2007).

En parallèle de son rôle au sein du complexe adhésif, la β-caténine prend part à la régulation de la transcription de gènes cibles de la voie Wnt. Lorsque la voie Wnt n'est pas activée, la β-caténine cytosolique est phosphorylée par la protéine GSK-3β, entraînant l'incorporation de la caténine dans un complexe de destruction cytosolique (comprenant notamment la protéine APC) menant au final à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. La liaison de Wnt à son récepteur Frizzled et au co-récepteur LRP (Low Density Lipoprotein-Related Protein) permet l'inhibition de cette dégradation par inhibition de la GSK-3β. La β-caténine ainsi stabilisée est transloquée dans le noyau où elle s'associe avec des répresseurs ou des co-activateurs de transcription de la famille TCF/LEF contrôlant l'expression de gènes cibles de cette voie de signalisation, tels que les gènes codant pour la cycline D1 ou cMyc. De nombreuses études ont mis à jour des correspondances entre la β-caténine associée aux cadhérines et celle de la voie Wnt, mais l'interaction croisée de la voie Wnt avec l'adhésion cadhérine dépendante reste encore hypothétique (Amin and Vincan, 2012).

2.2.3. L'α-caténine

L'α-caténine diffère considérablement des autres caténines au niveau de sa séquence en raison de l'absence de domaine Armadillo. L'α-caténine est une protéine d'environ 102 kDa, présente sous 3 isoformes : E (pour épithélial), N (pour neuronal) et T (trouvé dans les testicules et le cœur). Elle présente une forte homologie avec la vinculine et contient 3 domaines d'homologie: VH1 à 3 (Vinculin homology) (figure 7).

Le **domaine N terminal** de l'α-caténine comporte une région d'homodimérisation chevauchant le domaine de liaison à la β-caténine (Koslov et al., 1997; Pokutta and Weis, 2000), expliquant pourquoi l'α-caténine ne peut pas être dimérique lorsqu'elle lie la β-caténine. La

phosphorylation de l'α-caténine sur sa tyrosine 148 augmente son affinité pour la β-caténine (Burks and Agazie, 2006) tandis que la phosphorylation de la tyrosine 142 de la β-caténine diminue l'affinité (Piedra et al., 2003). La **région centrale** de l'α-caténine comprend le domaine VH2, site de liaison de protéines telles que la vinculine et l'afadine (Takai et al., 2008), la formine et l'α-actinine. Ce domaine VH2 contient également le **domaine de modulation** (domaine M), domaine qui permettrait le repliement de la protéine sur elle-même, régulant sa liaison à la vinculine (Yonemura et al., 2010). L'**extrémité C terminale** de l'α-caténine est la région de liaison à l'actine ainsi qu'aux protéines ZO-1 et EPLIN. L'α-caténine possède donc la capacité de lier l'actine directement et indirectement en interagissant avec d'autres protéines de liaison à l'actine.

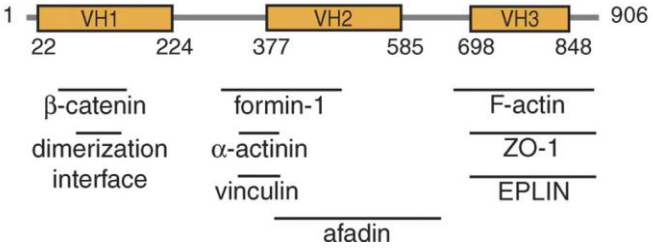


Figure 7 | Représentation schématique des différents domaines de l'α-caténine. Les domaines de liaison avec les différents partenaires de l'α-caténine sont représentés par un trait noir en-dessous du schéma de l'α-caténine. En jaune sont représentés les domaines d'homologie à la vinculine. D'après (Maiden and Hardin, 2011).

L'α-caténine est un important régulateur de l'**ancrage des cadhérines à l'actine**. Cependant elle joue également un rôle clé dans la régulation de la **prolifération cellulaire**. Lorsque son expression est supprimée, les cellules de l'épiderme de souris mutantes répondent mal aux facteurs de croissance et hyperprolifèrent (Vasioukhin et al., 2001). Dans le cortex cérébral, l'absence d'α-caténine raccourcit la durée du cycle cellulaire et diminue le taux d'apoptose via une suractivation de la voie de signalisation Hedgehog (Lien et al., 2006). Des travaux plus récents dans des cellules épithéliales démontrent également que l'α-caténine inhibe et exclue du noyau le co-activateur de transcription YAP (Yes-associated protein) en le séquestrant dans le cytoplasme et permettrait ainsi la régulation de la prolifération cellulaire par la voie de signalisation Hippo (Kim et al., 2011; Silvis et al., 2011).

2.2.4. La vinculine

La vinculine est une protéine de 117 kDa qui partage avec l'α-caténine des similarités structurales (Rudiger, 1998), en effet ces deux protéines peuvent d'une part lier directement l'actine et d'autre part des protéines s'associant à l'actine. Cependant, l'α-caténine n'est localisée qu'au niveau des adhésions cadhérines dépendantes alors que la vinculine est retrouvée au niveau des adhésions focales et des adhésions cadhérines (Pokutta and Weis, 2002).

La vinculine possède un domaine amino-terminal et carboxy-terminal (riche en prolines) respectivement d'environ 90kDa et 30kDa (Ziegler et al., 2006). Le domaine N-terminal permet d'interagir avec les protéines α-caténine, taline et α-actinine, tandis que le domaine carboxy-terminal peut s'associer avec la paxilline ou encore l'actine. L'interaction des domaines amino et carboxy-terminaux entraîne une auto-inhibition de la protéine. En effet cette interaction en tête-

à-queue empêche la liaison de certains de ses partenaires tels que la taline et l'α-actinine. Des études récentes ont suggéré que l'α-caténine pouvait intervenir dans l'activation de la vinculine aux contacts cadhérine dépendants (Choi et al., 2012; Peng et al., 2012).

2.3. Régulation de l'expression des cadhérines à la surface cellulaire

Les cadhérines étant des protéines d'adhésion transmembranaires, leur routage vésiculaire jusqu'à la membrane plasmique est donc nécessaire pour qu'elles puissent assurer leur fonction. Nous allons voir dans cette partie comment les cadhérines sont adressées au contact et quels phénomènes régulent leur maintien au niveau de la zone d'adhésion.

2.3.1. Adressage des cadhérines à la membrane plasmique

Les cadhérines, une fois synthétisées dans le réticulum endoplasmique et après leur passage par l'appareil de Golgi, sont transportées dans des vésicules jusqu'à la membrane plasmique le long des **microtubules**. L'association des caténines avec différents types de moteurs moléculaires liant les microtubules favoriserait le routage correct jusqu'à la membrane plasmique.

Le transport des cadhérines du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi dépendrait de la **β-caténine** qui d'une part serait liée à la cadhérine, et d'autre part interagirait indirectement avec le complexe **dynéine-dynactine** (Nakamura et al., 2010). Le complexe dynéine-dynactine est composé du moteur protéique dynéine et de la dynactine permettant la liaison du moteur avec son cargo (Vallee et al., 2012).

Des études ont mis en avant le rôle de la **caténine p120** dans le transport des vésicules contenant des cadhérines jusqu'à la membrane plasmique, grâce à son association avec un moteur moléculaire se déplaçant vers l'extrémité (+) des microtubules, les **kinésines** (Chen et al., 2003; Mary et al., 2002; Yanagisawa et al., 2004). D'autres expériences démontrent que l'adressage de la N-cadhérine dans les cellules du neuroépithélium nécessiterait les moteurs moléculaires de la famille KIF3 s'associant à la β-caténine (Teng et al., 2005).

2.3.2. Régulation du maintien des cadhérines à la membrane plasmique

Par ailleurs, la **caténine p120** joue un rôle majeur dans la stabilisation des cadhérines à la membrane plasmique. Des expériences effectuées dans le laboratoire de Reynolds démontrent que l'inhibition de l'expression de la caténine p120 par siRNA d'une part diminue la quantité totale de cadhérine et d'autre part, induit une perte de l'adhésion intercellulaire (Davis et al., 2003). La liaison de cette caténine au domaine juxtamembranaire des cadhérines cache un motif dileucine qui est reconnu par des protéines adaptatrices impliquées dans l'endocytose. Le démasquage de ce motif conduit à l'endocytose clathrine dépendante des cadhérines toujours associées à la β-caténine (Ishiyama et al., 2010) qui peuvent ensuite être soit dégradées après adressage aux lysosomes, soit recyclées pour pouvoir ensuite retourner à la membrane. La caténine p120 masque également des tyrosines pouvant être phosphorylées par la kinase **Src** et

qui seraient reconnues par l'ubiquitine ligase **Hakai** (Fujita et al., 2002; Hartsock and Nelson, 2012) menant à la dégradation des cadhérines dans les lysosomes (figure 8).

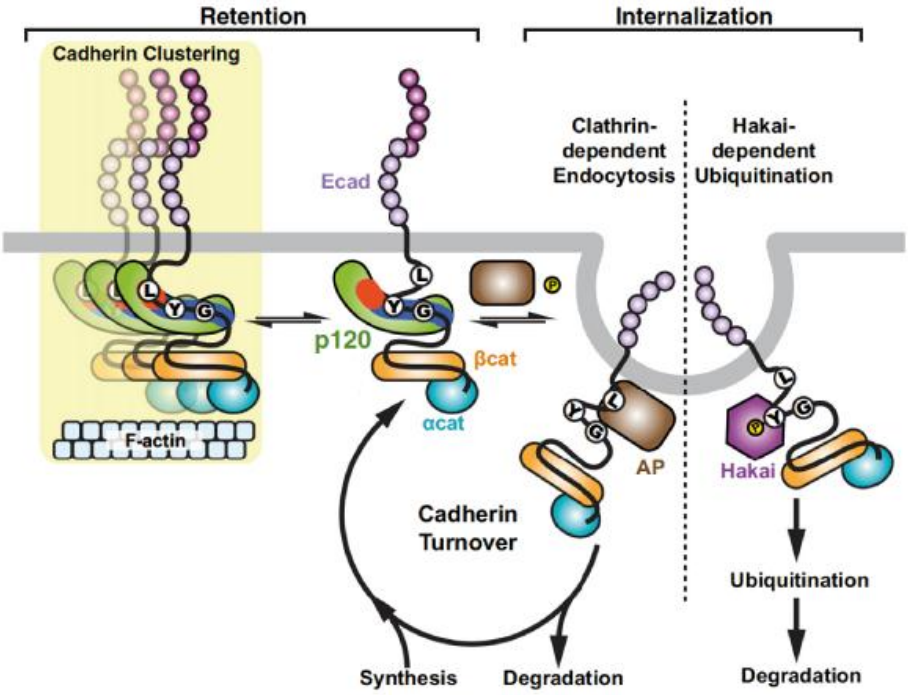


Figure 8 | **Rôles de la caténine p120 dans le maintien des cadhérines à la membrane plasmique.**
La liaison de la caténine p120 au domaine intracellulaire des cadhérines permet le masquage d'un motif dileucine (L) et de tyrosines phosphorylables (Y). Des protéines adaptatrices (AP) et Hakai reconnaissent respectivement le site L et les tyrosines phosphorylées, facilitant l'endocytose du complexe adhésif pouvant être ensuite recyclé ou dégradé. D'après (Ishiyama et al., 2010).

Des travaux portant sur la migration de cellules corticales au cours du développement cérébral ont démontré que l'endocytose des cadhérines pouvait être régulée en fonction du stade de migration de la cellule neuronale (Kawauchi et al., 2010). L'endocytose de la N-cadhérine dépendrait des **GTPases Rab** (GTPase Ras-like). Les GTPases Rab régulent l'adressage, le transport et la reconnaissance des vésicules aux compartiments intracellulaires de destination, et chaque compartiment est associé à des Rab différentes (pour revue : (Hutagalung and Novick, 2011)). La quantité de N-cadhérine à la membrane plasmique serait régulée par l'endocytose dépendante de la protéine Rab5, et pourrait être ensuite recyclée via des vésicules associées à Rab11, ou dégradée dans les lysosomes via des vésicules associées à Rab7 (Kawauchi et al., 2010).

La petite GTPase **Rap1** jouerait elle aussi un rôle dans le maitien des cadhérines à la surface membranaire. En effet des études réalisées dans des cellules épithéliales MDCK démontrent que Rap1 est enrichie aux contacts et que son activation promeut l'adhésion dépendante de la E-cadhérine (Asuri et al., 2008; Price et al., 2004). La petite GTPase **Rap1** a été également montrée comme importante pour le contrôle du recyclage de la N-cadhérine dans les cellules neuronales (Franco et al., 2011; Jossin and Cooper, 2011) (figure 9). Cette petite GTPase agirait en aval de Dab1, une protéine adaptatrice des récepteurs de la voie Reelin, et favoriserait

la migration cellulaire grâce à l'apport de vésicules N-cadhérine au niveau du front de migration des cellules. Cette voie de signalisation Rap1 concernerait un sous-ensemble de vésicules à cadhérines non associées à la caténine p120 (Balzac et al., 2005).

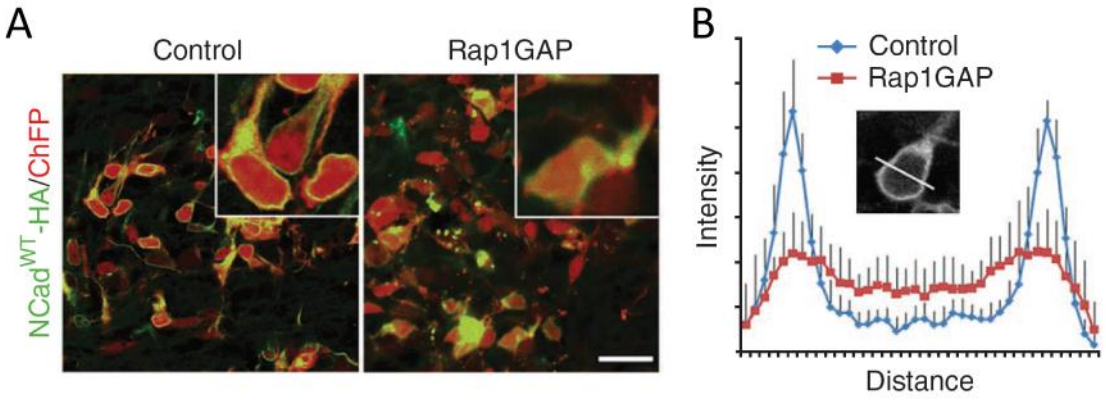


Figure 9 | La petite GTPase Rap1 régule les niveaux membranaires de N-cadhérine.
A : Afin de tester le rôle des protéines Rap dans le contrôle de l'expression de la N-cadhérine à la surface membranaire, Jossin et collaborateurs ont électroporé *in utero* le cortex de souris avec (i) une construction exprimant la N-cadhérine sauvage avec un tag HA ($Ncad^{WT}$-HA, vert), (ii) la construction ChFP (rouge) et (iii) un vecteur contrôle ou la construction Rap1GAP. La construction ChFP permet de visualiser toutes les cellules électroporées et Rap1GAP entraîne l'inhibition de tous les membres de la famille Rap. Barre d'échelle 20µm.
B : Les auteurs ont ensuite mesuré le profil d'intensité moyenne de $Ncad^{WT}$-HA après immunomarquage à travers le corps cellulaire des neurones et ont pu constater que la quantité de N-cadhérine à la membrane était diminuée lors de l'inhibition des protéines Rap (Jossin and Cooper, 2011).

2.4. L'établissement des contacts intercellulaires dépendants des cadhérines

Suite à leur adressage à la membrane plasmique, les cadhérines s'engagent dans des processus d'adhésion intercellulaire par un mécanisme nécessitant d'une part des interactions entre leurs domaines extracellulaires et d'autre part une association avec le cytosquelette d'actine.

2.4.1. Mécanismes d'interaction en *trans* des ectodomaines de cadhérine

Le domaine extracellulaire des cadhérines est suffisant pour l'initiation de l'assemblage des contacts. En effet des expériences réalisées avec des ectodomaines de E-cadhérine associés à des liposomes permettent l'adhésion entre ces liposomes (Harrison et al., 2011). Le domaine **EC1** a été montré comme le médiateur majeur de l'homodimérisation en *trans* de cadhérines provenant de deux cellules adjacentes (figure 10) et possède un rôle très important dans la reconnaissance et l'adhésion homophilique des cadhérines. C'est au sein de ce domaine que les cadhérines classiques de type I vont **échanger des brins** entre partenaires (le « strand-swapping ») : le **brin A***, qui est la partie la plus distale du brin A et séparée par une boucle

flexible du reste du brin, va ancrer son résidu **Trp2** dans la poche hydrophobe formée par le domaine EC1 de la cadhérine située en *trans*. La structure générale des cadhérines de type II est très similaire à celle des cadhérines de type I, la différence majeure est leur poche hydrophobe formée par le domaine EC1 qui est plus large (Patel et al., 2006). Les cadhérines de type I possèdent au voisinage de cette poche hydrophobe un tripeptide caractéristique Histidine-Alanine-Valine (**HAV**) qui est requis pour la spécificité d'adhésion. Pour les cadhérines de type II, ce motif est remplacé par le motif Glutamine-Alanine-Valine, QAV. Le mécanisme d'échange de brins est similaire pour les cadhérines classiques de type II mais réalisé par l'association des deux tryptophanes 2 et 4 dans une poche hydrophobe plus large (Patel et al., 2006) (figure 10).

Les cadhérines interagissent en *trans* grâce à l'échange du brin A*, cependant ce brin A* peut s'associer à la poche hydrophobe de son propre domaine EC1, induisant une conformation fermée de ce dernier. Cet état monomérique est en équilibre avec l'homodimère en *trans*. L'hypothèse la plus probable avancée aujourd'hui pour expliquer la transition du monomère au dimère en *trans* est un processus en trois étapes (figure 11) :
- 1ère étape : rencontre de deux monomères en conformation fermée et formation d'un dimère sans que les brins des domaines EC1 soient échangés.
- 2e étape : formation d'un dimère intermédiaire dont l'allure ressemble à celle d'un X : le **dimère X**. Des études crystallographiques ont révélé cet intermédiaire dont l'interface est située entre les domaines EC1 et EC2. Ce dimère X permet le rapprochement des deux brins A de chaque EC1 et sa formation est rapide et dépendante de la présence du calcium.
- 3e étape : échange des brins A* des deux EC1 menant à la formation d'un dimère « mature ».
Au cours de ces différentes étapes le calcium est important et sa liaison aiderait à « l'ouverture » du brin A en induisant des contraintes rendant énergétiquement plus favorable la conformation ouverte.

Le domaine EC1 est important pour l'interaction en *trans* mais seul il ne permet pas de réaliser des contacts cellulaires cadhérine-dépendants. Des études ont montré que le minimum requis pour effectuer un contact intercellulaire était la présence des deux domaines EC1 et EC2 (Shan et al., 2004). La formation d'un contact entre deux cellules par les cadhérines est composée de deux phases cinétiques : une cinétique d'association rapide puis une lente. Chien et collaborateurs (Chien et al., 2008) ont mesuré les forces d'adhésion en mettant en contact une cellule de type CHO exprimant la C-cadhérine et sur une cellule sanguine présentant différentes combinaisons de domaines EC à sa surface, puis en tirant avec des micropipettes sur chaque cellule. Ils ont pu mettre en évidence que la première phase de liaison rapide (avec une probabilité faible d'obtenir une adhésion après avoir mis les cellules en contact) nécessitait la présence des domaines EC1 et EC2. Cependant la deuxième phase de liaison plus lente (mais à l'inverse avec une probabilité forte d'obtenir une adhésion après avoir mis les cellules en contact) requérait le domaine EC3.

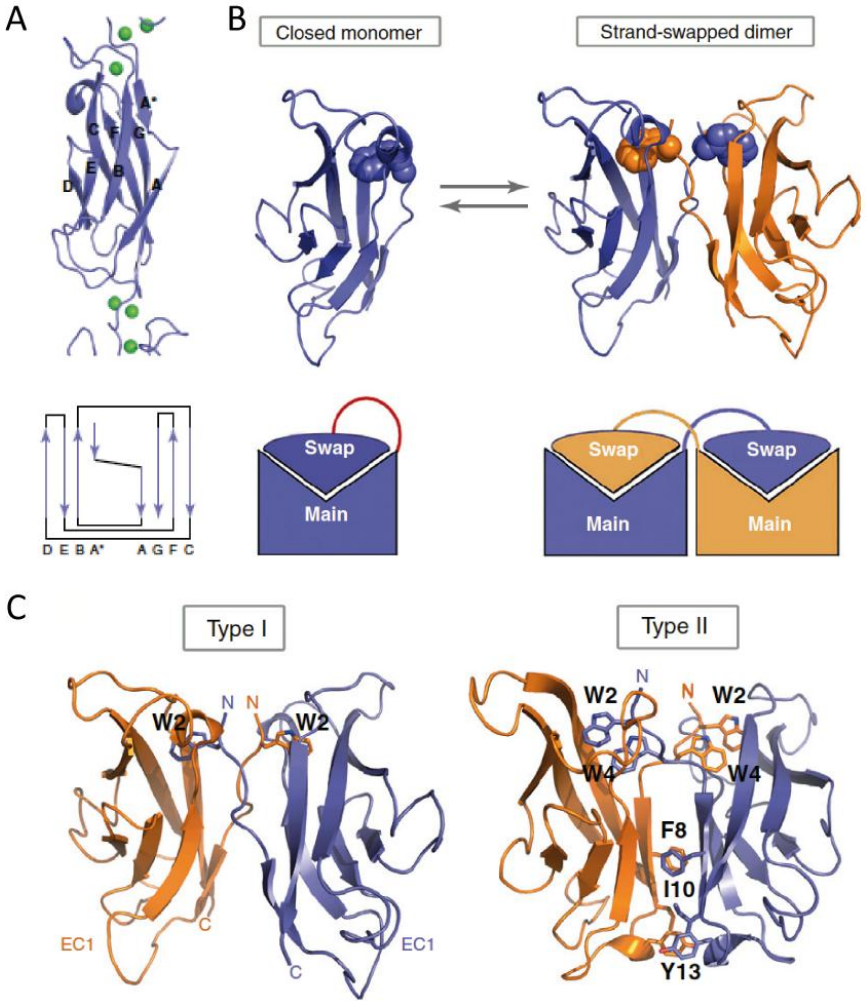


Figure 10 | Le domaine EC1 est responsable de l'interaction en *trans* des cadhérines.
A : Structure tridimensionnelle en ruban du domaine EC1 de cadhérines de type I. Le domaine EC1 possède 7 brins β antiparallèles (A - G) qui se replient comme représenté dans le digramme de topologie en-dessous. Le brin A est séparé en deux parties reliées par une boucle : les brins A et A*. Les ions calcium sont représentés par des sphères vertes. **B :** Le domaine EC1 peut être en conformation fermée avec son tryptophane 2 ancré dans sa propre poche hydrophobe (schéma de gauche). Lors d'une interaction en *trans* (schéma de droite), les deux domaines EC1 vont échanger leurs brins A* et les tryptophanes vont s'ancrer dans les poches hydrophobes de leur partenaire (« strand-swapping »). **C :** Représentation en ruban des interactions de deux domaines EC1 de cadhérines de type I (E-cadhérine) et de type II (cadhérine 11). Les résidus de l'interface adhésive caractéristique de chaque famille sont représentés par des bâtons, permettant de visualiser une zone d'interaction beaucoup plus grande pour les cadhérines classiques de type II. Adapté de (Brasch et al., 2012).

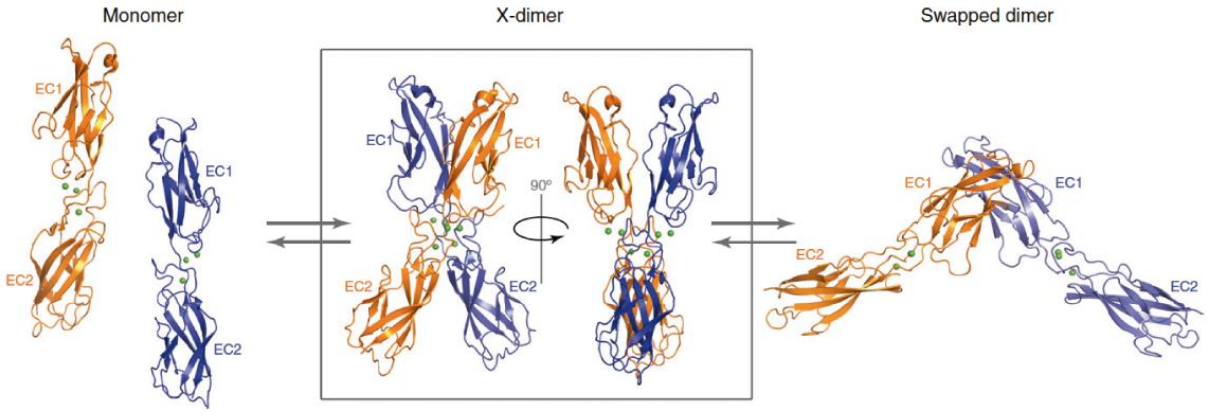


Figure 11 | Modèle de mécanisme de formation d'un dimère *trans*.
Représentation des trois étapes putatives permettant de former un homodimère *trans* en passant par la formation d'un intermédiaire n'échangeant pas de brins entre les domaines EC1. Sont représentés uniquement les domaines EC1 et EC2 par souci de clarté. Les ions calcium sont représentés par des sphères vertes. Tiré de (Brasch et al., 2012).

2.4.2. Interactions *cis* et *trans* et croissance des adhésions dépendantes des cadhérines

Les adhésions dépendantes des cadhérines sont constituées de cadhérines accumulées de manière compacte au contact (Adams et al., 1998; Lambert et al., 2007). L'hypothèse avancée en premier lieu pour expliquer ce regroupement est celle de « diffusion – piégeage » (« diffusion trapping ») (Mege et al., 2006). En effet les récepteurs cadhérines diffuseraient librement à la surface membranaire puis s'accumuleraient une fois engagés dans un contact en *trans* (Lambert et al., 2002).

De plus, des interactions en *cis* entre les cadhérines existent et des études ont montré qu'elles pourraient contribuer à la maturation des contacts. Cette dimérisation des cadhérines en *cis* serait effectuée au niveau de la base du domaine EC1 avec l'apex du domaine EC2 de la cadhérine voisine (figure 12A). Des mutations dans le site d'interaction en *cis* des cadhérines (en positions 81 et 175, donc respectivement dans les domaines EC1 et EC2) ont montré que ces zones étaient nécessaires pour cette accumulation (Harrison et al., 2011). Un élément régulateur de cette dimérisation en *cis* serait l'état de N-glycosylation du domaine extracellulaire des cadhérines. Des expériences de cross-linking des domaines extracellulaires ont montré que des sites de N-glycosylation localisés dans les domaines EC2 et EC3 de la N-cadhérine réguleraient la formation de dimères *cis* N-cadhérine (Guo et al., 2009).

Les interactions *cis* et *trans* des cadhérines sont donc très importantes pour l'initiation des contacts et l'accumulation des cadhérines. Ces deux processus coopéreraient afin d'établir une adhésion avec les cellules environnantes et d'orienter les domaines extracellulaires pour permettre l'accumulation latérale des cadhérines (figure 12B) (Brasch et al., 2012; Wu et al., 2010).

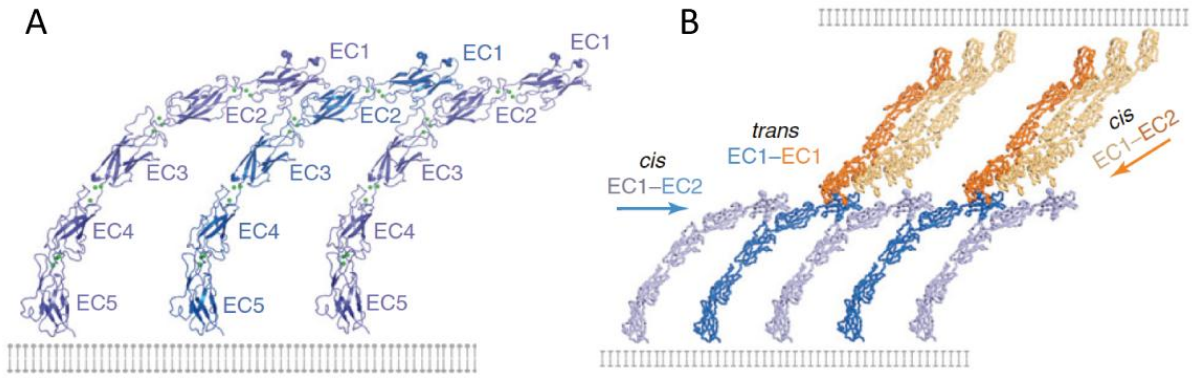


Figure 12 | Interactions *cis* et *trans* au cours de l'engagement des cadhérines dans un contact.
A : Interactions en *cis* entre les domaines EC1 et EC2 de molécules de N-cadhérine. **B :** Les interactions en *trans* des homodimères permettent une orientation des dimères *cis*, de façon à ce que ces dimères *cis* puissent former des interactions *trans* avec plusieurs dimères *cis* de la cellule voisine. Adapté de (Brasch et al., 2012).

2.4.3. Contribution du remodelage du cytosquelette d'actine et de l'ancrage des cadhérines à l'actine dans l'établissement des contacts

L'association des cadhérines via leur domaine extracellulaire est peut-être suffisante pour initier le contact mais la poursuite de la formation du contact nécessite que les cadhérines établissent un lien avec les filaments d'actine, élément du cytosquelette recruté au niveau des jonctions adhérentes (Hirano et al., 1987). La destruction du cytosquelette d'actine par des drogues dépolymérisatrices telle que la cytochalasine D (Angres et al., 1996; Jaffe et al., 1990) ou encore la délétion du domaine intracellulaire des cadhérines (Nagafuchi and Takeichi, 1988) inhibent l'agrégation cellulaire dépendante des cadhérines. L'association cadhérine-actine est donc essentielle pour l'établissement des contacts et elle est réalisée grâce à l'interaction des caténines avec les cadhérines et l'actine (Drees et al., 2005a; Rimm et al., 1995).

a. Le cytosquelette d'actine

L'actine est une protéine globulaire de 42kDa exprimée par tous les eucaryotes, elle est l'une des protéines majoritaires du cytosol. Les monomères d'actine (actine G pour globulaire) s'assemblent en filaments sous la forme de deux hélices enroulées qui sont dénommés actine F (pour filamenteuse) ou encore microfilaments (Bugyi and Carlier, 2010). Les polymères d'actine sont polarisés avec une extrémité plus, appelée extrémité dentelée (ou « barbed end »), où les monomères d'actine s'associent plus rapidement *in vitro* qu'à l'extrémité moins qui est dénommée extrémité pointue (ou « pointed end ») (voir figure 13). Les monomères d'actine sont des protéines pouvant lier l'ATP. Après l'incorporation du monomère d'actine dans le polymère, le phosphate γ de l'ATP est clivé puis le phosphate inorganique Pi est relargué. La perte de ce Pi est associée à la déstabilisation du polymère d'actine. En raison de son élongation plus rapide, l'extrémité plus possède des sous-unités avec soit de l'ATP, de l'ADP-Pi ou de l'ADP alors que l'extrémité moins est constituée majoritairement de protéines liés à l'ADP favorisant sa dépolymérisation (pour revues voir (Campellone and Welch, 2010; Nurnberg et al., 2011; Pollard and Borisy, 2003). De nombreuses protéines régulent et accélèrent *in vivo* ces étapes de

polymérisation de l'actine, ainsi que les processus de coupure et de dépolymérisation des filaments dans les différents compartiments de la cellule (voir ci-dessous et le tableau 2).

Ces processus régulent la formation et la dynamique locale du cytosquelette d'actine, générant des forces de protrusion nécessaires pour la formation d'un contact ou pour la migration cellulaire, ou encore générant une structure stabilisant la morphologie de la cellule. La diversité de régulateurs de l'actine permet une modulation complexe de la structure de celle-ci, qui peut par exemple être sous la forme d'un réseau branché, de faisceaux de câbles ou encore de fibres contractiles (voir texte ci-dessous et figure 13).

Actine branchée du lamellipode

L'actine sous la forme d'un réseau branché est une structure très importante pour la formation des lamellipodes. Ce maillage de filaments d'actine est réalisé grâce au complexe nucléateur **Arp2/3** (Actin related protein 2/3) qui est composé de 7 sous-unités (Arp2, Arp3, ARPC 1 à 5). Une fois activé par les protéines de la famille **WASP** (Wiskott-Aldrich syndrom protein) localisées à la membrane, ce complexe nucléateur va s'associer à l'extrémité pointue d'un monomère d'actine puis à un filament déjà formé, avec un angle de 70°. Un nouveau polymère d'actine est ainsi constitué, et va s'allonger grâce à des facteurs favorisant la polymérisation telle que la **profiline**. Des protéines comme la **gelsoline** vont coiffer les extrémités plus de ces filaments d'actine et empêcher leur polymérisation, tandis que d'autres comme l'**ADF/cofiline** (Actin depolymerizing factor/cofiline) vont déstabiliser l'actine associée à l'ADP afin de générer de nouvelles extrémités plus.

La structure de l'actine dans le lamellipode est donc le résultat de la balance entre les phénomènes de branchement/croissance/coiffage et de débranchement/dépolymérisation des filaments d'actine.

Actine câblée des filopodes

L'actine câblée est une structure qui peut être localisée à l'arrière des lamellipodes et dans les filopodes. Elle est composée de filaments d'actine orientés de manière parallèle. Leur nucléation peut être effectuée par **Arp2/3**. L'élongation de ces filaments non branchés est assurée par les **formines**, comprenant notamment les protéines de la famille mDia, et par des protéines de la famille **Ena/VASP** (Enabled/Vasodilator-stimulated phophoprotein). L'une des hypothèses avancée par Gupton et collaborateurs (Gupton and Gertler, 2007) est que les filopodes émergeraient des lamellipodes suite à la nucléation de filaments par Arp2/3, par l'association de ces filaments par la protéine de réticulation fascine et une activité protectrice anti-coiffage par les protéines de la famille Ena/VASP.

Les fibres d'actine contractiles ou fibres de stress

Les fibres de stress d'actine sont des structures câblées localisées à l'arrière des lamellipodes. La formation de ces fibres nécessite la formine **mDia1**, la protéine de fasciculation **α-actinine** et l'activité de la **myosine II**, une myosine non musculaire (pour revue voir (Parsons et al., 2010)). Les filaments d'actine sont associés de manière anti-parallèle, liés grâce à l'α-actinine et la contractilité est générée grâce à l'activité de la myosine II.

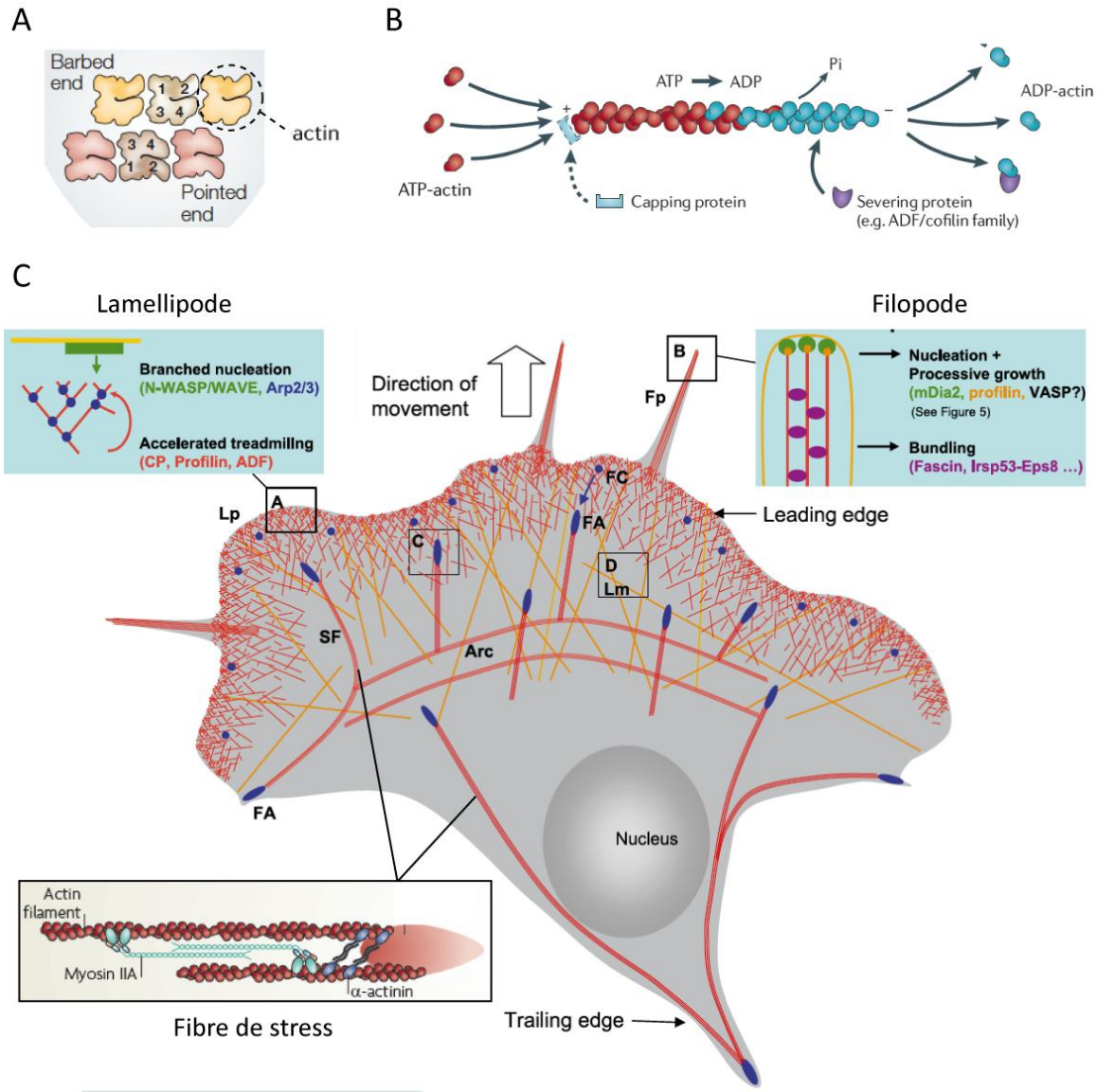


Figure 13 | Polymérisation et organisation du cytosquelette d'actine.
A : L'actine filamenteuse est composée de deux protofilaments antiparallèles enroulés en hélice. Le microfilament possède une extrémité plus ou barbée (« barbed end ») et une extrémité moins ou pointue (« pointed end »). Une molécule d'actine est sous-divisée en 4 domaines globulaires, avec les domaines 1 et 3 du côté plus et les domaines 2 et 4 vers l'extrémité moins. Les molécules d'actine lient l'ATP au niveau de la fente entre les domaines 2 et 4. **B :** L'association de monomères d'actine liées à l'ATP à l'extrémité plus est beaucoup plus rapide qu'à l'extrémité moins. L'hydrolyse spontanée de l'ATP et la dissociation du phosphate (Pi pour phosphate inorganique) déstabilise le filament et le rend plus susceptible à la dépolymérisation par des protéines de la famille ADF/cofiline. Des protéines de coiffage peuvent s'associer avec l'extrémité plus et inhiber l'élongation du filament. **C :** Représentation schématique de l'organisation de l'actine dans une cellule en migration. Au front de migration de la cellule, l'actine peut être sous forme branchée dans le lamellipode (Lp) et câblée dans les filopodes (Fp). A l'arrière de ce front de migration la cellule peut contenir des fibres d'actine contractile (ou appelées fibres de stress, SF). Adapté de (Deeks and Hussey, 2005; Le Clainche and Carlier, 2008; Parsons et al., 2010).

Protéine	Rôle	Fonctions
Arp2/3	Nucléation	Associé à l'extrémité pointue des monomères Génération de filaments d'actine branchés
WASP, cortactine	NPF	Associés à la membrane : recrutement et activation des nucléateurs
Profiline	Polymérisation	Liaison à l'actine G Polymérisation de l'actine à l'extrémité (+) du filament
Ena/VASP		Polymérisation de l'actine à l'extrémité (+) du filament Liaison avec la profiline aux sites de polymérisation Empêche le coiffage des extrémités (+)
Formine		Polymérisation de l'actine à l'extrémité (+) de filaments non branchés
ADF/cofiline	Dépolymérisation	Déstabilise l'ADP-actine F Génération de nouvelles extrémités (+)
Gelsoline	Coiffage	Liaison aux extrémités (+) pour empêcher la polymérisation
Fascine α-actinine	Réticulation	Formation de faisceaux d'actine (actine non branchée)
Myosine	Moteur moléculaire	Transport de protéines Contractilité de l'actine (association entre plusieurs filaments)

Tableau 2 | Protéines associées à l'actine régulant la structure et la dynamique de l'actine.
ADF : Actin depolymerizing factor, Arp2/3 : Actin related protein, NPF : nucleating promoting factor, VASP : Vasodilator-stimulated phophoprotein, WASP : Wiskott Aldrih syndrom protein.

b. Modes d'association des cadhérines à l'actine

L'association des cadhérines avec l'actine a longtemps été supposée comme faisant intervenir le complexe quaternaire cadhérine/β-caténine/α-caténine/actine (Kinbara et al., 2003; Morgan et al., 2007). Cependant aucune preuve directe confirmant l'existence de ce complexe n'a été rapportée.

Par des expériences de GST pull-down et de reconstitution d'assemblage de complexes cadhérines/caténines/actine sur des patches de membranes de cellules MDCK adhérant sur des substrats de E-cadhérine, le groupe de Nelson a démontré que si l'α-caténine était liée à la β-caténine, alors elle ne pouvait pas interagir avec l'actine (Yamada et al., 2005). De plus l'étude comparative de la dynamique des cadhérines/caténines avec celle de l'actine a révélé que l'actine était beaucoup plus dynamique au niveau des contacts. Ces résultats démontrent que l'association cadhérine/β-caténine/α-caténine est exclusive de celle de l'α-caténine avec l'actine. L'hypothèse formulée par les auteurs est que l'α-caténine régulerait de manière dynamique l'ancrage des cadhérines à l'actine en naviguant entre ces deux composants (figure 14).

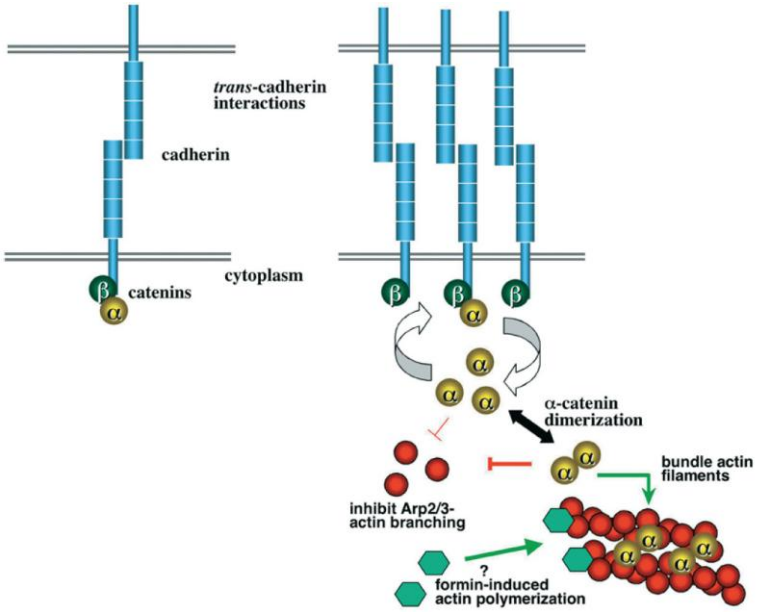


Figure 14 | Modèle d'association des cadhérines à l'actine proposé par Nelson.
Les contacts transitoires entre cadhérines (représentés sur la gauche) aboutissent à une accumulation des complexes cadhérine/β-caténine (représentation à droite) et à un recrutement de l'α-caténine. L'augmentation de la concentration de l'α-caténine au niveau des contacts et son échange entre les complexes cadhérine/β-caténine et le cytosol favorisent sa dimérisation. L'α-caténine dimérique (i) inhibe l'activité d'Arp2/3 –inhibant ainsi la formation d'actine branchée- et (ii) se lie à l'actine. L'α-caténine permettrait de compacter les filaments d'actine, et pourrait promouvoir la formation de câbles linéaires d'actine dépendante des formines (Pokutta et al., 2008).

L'α-caténine est une protéine centrale dans l'association des cadhérines à l'actine, cependant le lien qu'elle forme peut être également indirect. En effet l'α-caténine peut se lier à des protéines interagissant avec l'actine, telle que la **vinculine**. Des études réalisées par Yonemura et collaborateurs montrent par des immunomarquages de cellules épithéliales ainsi que des expériences d'interaction *in vitro* (GST-pull down), que l'α-caténine est capable de lier la vinculine sous l'effet de tensions appliquées par la myosine.

Au complexe α-caténine-vinculine s'ajoute également la protéine **EPLIN**. L'EPLIN est une protéine associée à l'actine inhibant sa dépolymérisation (Maul and Chang, 1999; Maul et al., 2003) et qui interagit avec l'α-caténine au niveau des jonctions adhérentes (Abe and Takeichi, 2008). Le laboratoire du professeur Takeichi a étudié dans des colonies de cellules épithéliales DLD1 les mécanismes de remodelage des jonctions adhérentes. Ils ont pu démontrer que l'EPLIN était recrutée par l'α-caténine au niveau des jonctions assurées par la E-cadhérine grâce à l'application de tensions réalisées par la myosine, et que l'EPLIN nécessitait la présence de la vinculine pour établir les jonctions adhérentes (Taguchi et al., 2011). Des études réalisées dans des cellules endothéliales avancent que le recrutement de l'EPLIN par l'α-caténine au niveau des complexes VE-cadhérine permettrait le dépliement de l'α-caténine nécessaire à la liaison de la vinculine mais serait indépendant de la myosine (Chervin-Petinot et al., 2012). Cependant ces mécanismes sont encore très débattus, ils pourraient être différents selon le type cellulaire.

D'autres travaux réalisés par Kobielak et collaborateurs ont mis en évidence une association entre le complexe adhésif associé aux cadhérines et le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'une isoforme de la **formine 1** (Kobielak et al., 2004). Kobielak et

collaborateurs utilisent comme modèle d'étude des kératinocytes n'exprimant pas l'α-caténine. Ces cellules présentent une mauvaise accumulation de E-cadhérine aux contacts intercellulaires, qui est sous forme de patches au lieu d'être continue le long du contact. Grâce à la surexpression d'une protéine chimère constituée (i) du domaine de liaison à la β-caténine de l'α-caténine (ii) fusionnée aux domaines de liaison à l'actine de la formine, ils restaurent formation correcte des contacts cellule-cellule. Ces auteurs proposent un modèle d'ancrage impliquant une liaison des cadhérines à l'actine via une interaction α-caténine-formine.

Cependant l'α-caténine pourrait influencer le cytosquelette d'actine de manière indépendante des cadhérines. L'α-caténine est une protéine qui peut former des hétérodimères avec la β-caténine en association avec la E-cadhérine l mais également des homodimères lorsqu'elle interagit avec l'actine (pour revue (Broders-Bondon et al., 2012)). Benjamin et collaborateurs se sont penchés sur le rôle que pouvait jouer cette fraction importante d'α-caténine (Benjamin et al., 2010). En séquestrant cet ensemble d'α-caténine aux mitochondries sans toucher aux protéines associées aux cadhérines, ils ont pu mettre en évidence que l'α-caténine cytosolique pouvait réguler la dynamique de l'actine et ceci de manière indépendante des adhésions cellule-cellule.

Le modèle d'association des cadhérines au cytosquelette d'actine initialement décrit comme une interaction cadhérine/caténines/actine est bel et bien révolu, laissant place à des modèles beaucoup plus complexes.

c. Ancrage des cadhérines à l'actine

Bien que le modèle d'interaction des cadhérines à l'actine soit toujours débattu, cette association cadhérine-actine est un processus requis pour l'initiation et la maturation des contacts. En effet après leur interaction en *trans*, les cadhérines vont s'ancrer au cytosquelette d'actine et cet ancrage va permettre de réguler la stabilisation et la dynamique des contacts dépendants des cadhérines (Lambert et al., 2002; Mege et al., 2006).

Initiation de la formation des contacts

L'initiation de la formation des contacts entre deux cellules débute par une forte activité lamellipodiale régulée par la polymérisation d'actine branchée. Lorsque les cadhérines sont engagées aux zones de contact naissantes, elles vont en premier lieu activer la RhoGTPase Rac1 par l'intermédiaire de la Pi3-kinase (Colello et al., 2012; Gavard et al., 2004; Kong et al., 2010; Lambert et al., 2002) (figure 15). Cette RhoGTPase à son tour active les protéines de la famille WASP, activateurs des nucléateurs de la polymérisation de l'actine Arp2/3 (Toyoshima and Nishida, 2007) générant un réseau d'actine branchée. Ensuite Rac1 recrute la cortactine qui est phosphorylée par la kinase Fer, protéine recrutée à la membrane via la caténine p120. La cortactine va induire indirectement la phosphorylation de la β-caténine, renforçant ainsi le lien cadhérine-β-caténine (El Sayegh et al., 2005; Xu et al., 2004).

Cependant le recrutement des cadhérines et leur accumulation va augmenter la concentration d'α-caténine. Cette dernière a un effet inhibiteur sur Arp2/3 (pour revues (Broders-Bondon et al., 2012; Choi et al., 2011)) et cette inhibition ferait partie des éléments régulant l'arrêt de la formation du lamellipode et la maturation du contact intercellulaire.

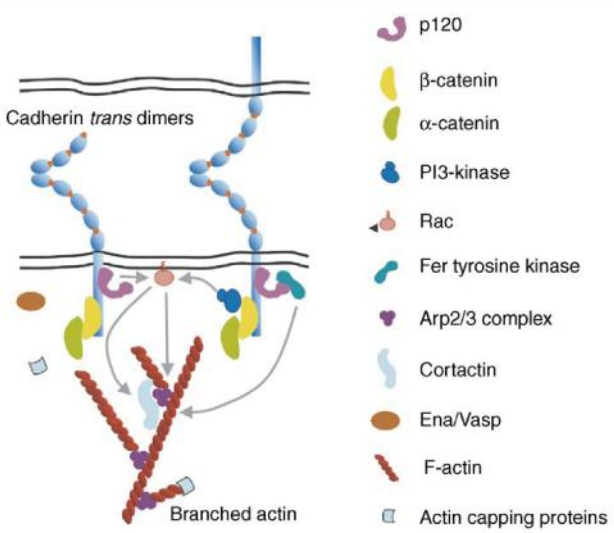


Figure 15 | Les interactions *trans* effectuées par les cadhérines déclenchent des voies de signalisation permettant le remodelage du cytosquelette d'actine.
Tiré de (Mege et al., 2006).

Stabilisation et dynamique des contacts

Afin d'étudier l'impact de l'engagement des cadhérines sur la formation des contacts, des expériences ont été réalisées en déposant des billes recouvertes de N-cadhérine recombinante sur des cellules myogéniques non différenciées ou des cônes de croissance. Ces expériences révèlent que la liaison des billes à la surface des cellules induit une accumulation d'actine et un recrutement de fibres de stress au niveau de la zone de contact (Lambert et al., 2000; Thoumine et al., 2006). Autre fait marquant, suite à leur dépôt les billes diffusent librement à la surface du lamellipode avant d'être ensuite immobilisées pour subir un mouvement dirigé vers l'arrière du lamellipode (Lambert et al., 2002). Ces travaux ont mis en évidence que cette traction de la bille recouverte de N-cadhérine vers l'arrière était due à l'ancrage des cadhérines au cytosquelette d'actine. Cet ancrage est régulé par Rac1, dont l'inhibition ne perturbe pas la liaison des billes mais uniquement le mouvement dirigé des billes ainsi que l'accumulation de l'actine aux zones de contacts bille-cellule (Lambert et al., 2002). Ces résultats suggèrent que l'engagement des cadhérines dans un contact permettrait de recruter des protéines régulant l'organisation de l'actine, telle que la RhoGTPase Rac1.

Le remodelage de l'actine permet en retour la régulation de la stabilisation et de la dynamique des contacts dépendants des cadhérines. Dans des épithélia de Drosophile, Cavey et collaborateurs ont pu mettre en évidence l'existence de deux types de réseau d'actine régulant différemment les populations d'E-cadhérine aux contacts intercellulaires (Cavey et al., 2008). Un premier réseau d'actine contractile présent tout le long de la membrane plasmique assurerait la mobilité des cadhérines au niveau de la membrane plasmique permettant leur recrutement au sein des adhésions. Un deuxième réseau d'actine très stable sous forme de petits patches perlet la stabilisation de cadhérines accumulées aux contacts.

3. Rôles de la N-cadhérine au cours de la mise en place du système nerveux central

Les cadhérines jouent un rôle très important au cours du développement embryonnaire. La N-cadhérine prend part aux différentes étapes du développement du système nerveux qui incluent notamment la neurulation, la mise en place du neuroépithélium, la migration et la croissance neuritique.

3.1. Mise en place du neuroépithélium

3.1.1. Mise en évidence du rôle des complexes adhésifs

Au cours du développement embryonnaire, la E-cadhérine est exprimée dans l'ectoderme. Au cours de l'étape de neurulation, l'acquisition de l'expression de la N-cadhérine au niveau de l'ectoderme en parallèle à l'inhibition de celle de la E-cadhérine conduit à la formation du tube neural. Le tube neural donne ensuite naissance aux différentes structures du système nerveux central et périphérique (Redies, 2000).

Le neuroépithélium est composé de plusieurs strates de cellules neuronales et l'agencement de ces strates est primordial pour le développement du système nerveux. Les complexes cadhérines/caténines sont accumulés du côté apical des cellules neuroépithéliales. L'absence d'α-caténine au niveau des contacts intercellulaires entraîne des problèmes de lamination dans le cervelet, l'hippocampe et le cortex. En effet des travaux utilisant des souris knockout de l'αE-caténine démontrent que ces souris mutantes possèdent une hyperplasie du cortex (Lien et al., 2006). Une autre lignée de souris mutantes, les souris cdf (cerebellar deficient folia), montre quant à elle une hypoplasie du cervelet ainsi qu'une dispersion des cellules pyramidales de l'hippocampe (Park et al., 2002). Ces travaux mettent en évidence que dans ces souris mutantes le gène codant pour l'α-N-caténine est tronqué dans sa partie carboxy terminale supprimant ainsi le domaine de liaison avec l'actine. L'expression de la caténine restaure une morphologie normale du cervelet et de l'hippocampe, suggérant que l'α-caténine est importante pour les phénomènes de lamination du neuroépithélium.

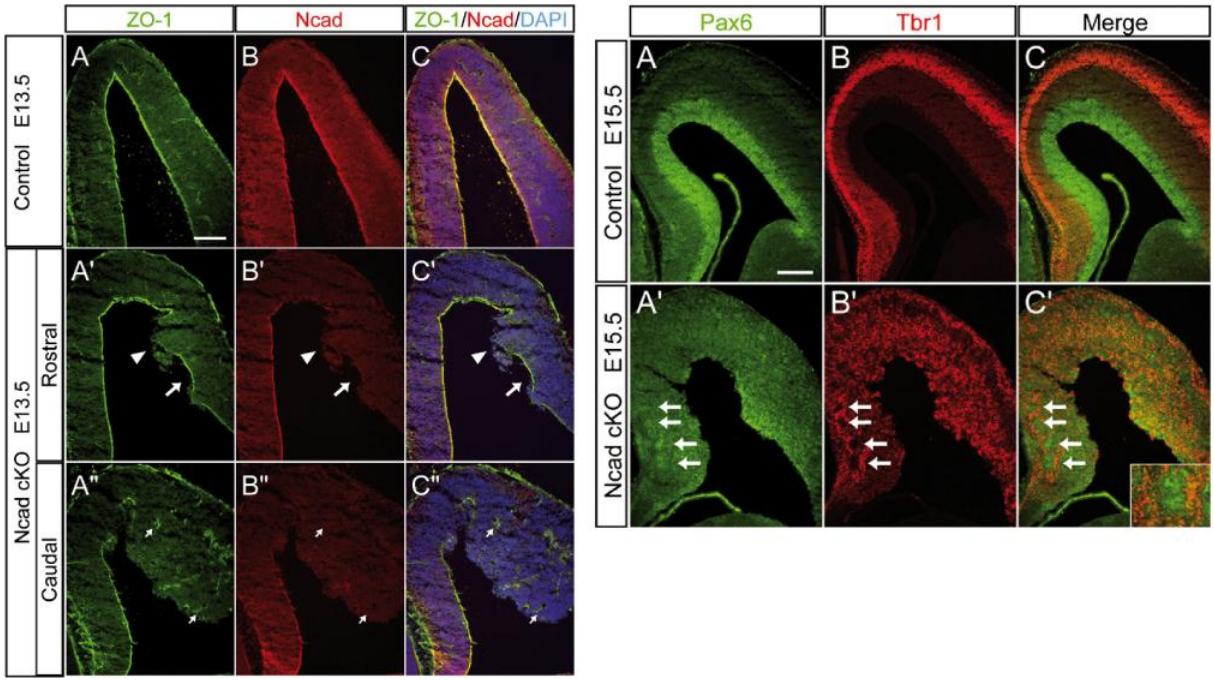


Figure 16 | La N-cadhérine est nécessaire au cours de la formation du cortex cérébral.
Panneau de gauche : Au cours du développement du cortex murin, ZO-1 (vert) et la N-cadhérine (rouge) sont fortement accumulés à la surface ventriculaire du neuroépithélium (Control E13.5). L'inhibition conditionnelle de l'expression de la N-cadhérine dans le cortex de souris mutantes au stade embryonnaire 13.5 (Ncad cKO E13.5) entraîne la perturbation de la formation de ces complexes jonctionnels. Ce knockout conditionnel de N-cadhérine démontre qu'elle est importante pour la polarisation du neuroépithélium.
Panneau de droite : Pax6 (vert) et Tbr1 (rouge) sont des facteurs de transcription exprimés respectivement dans les cellules de la glie radiaire (donc au niveau de la zone ventriculaire) et dans les neurones différenciés des couches supérieures du cortex (Control E15.5). Les souris KO conditionnelles pour la N-cadhérine ne possèdent plus de lamination correcte du cortex, les différentes couches du neuroépithélium étant complètement mélangées. Les flèches indiquent dans les cerveaux mutants l'organisation de cellules en rosettes.

L'α-caténine agit en étroite relation avec les cadhérines cependant elle peut posséder des fonctions indépendantes des protéines d'adhésion, c'est pourquoi des équipes ont cherché à supprimer l'expression de la N-cadhérine pour étudier son implication directe dans le développent neural. Des souris knockout N-cadhérine ont été générées mais la suppression de la N-cadhérine dans l'organisme entier de l'animal ne permettait pas cette étude en raison d'une mort des souris mutantes au 10e jour de leur développement embryonnaire, provoquée par des défauts cardiaques (Radice et al., 1997). Des souris mutantes conditionnelles pour la N-cadhérine au niveau du cortex et de l'hippocampe ont permis d'éviter ce problème (Kadowaki et al., 2007). La N-cadhérine est normalement retrouvée fortement accumulée au niveau apical du neuroépithélium. L'inhibition de l'expression de la N-cadhérine entraîne la perte de la formation des complexes jonctionels (figure 16 panneau de gauche) et le mélange des différentes couches corticales (figure 16 panneau de droite). Les cellules de la glie radiaire et neuroépithéliales n'exprimant pas la N-cadhérine ne réussissent également pas à étendre leurs processus neuritiques de part et d'autre du cortex. Cette complète désorganisation du cortex montre que la N-cadhérine est importante pour l'établissement et le maintien de la polarité du neuroépithélium (formation des complexes jonctionnels), et pour la lamination du cortex.

3.1.2. La N-cadhérine dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des précurseurs neuronaux

Au cours du développement, le cerveau possède différentes zones de prolifération neuronale. La zone ventriculaire est la région principale de prolifération de précurseurs neuronaux corticaux. Cette région ne possède pas de structure cellulaire lui permettant de former une niche régulant la prolifération et la différenciation des précurseurs. Noles et collaborateurs ont montré que l'inhibition de la signalisation β-caténine après surexpression de la N-cadhérine sauvage ou l'expression d'un mutant sans domaine extracellulaire affectent la prolifération et la différenciation des précurseurs neuronaux (Noles and Chenn, 2007).

Les précurseurs neuronaux peuvent être maintenus en culture *in vitro* où ils forment des groupes de cellules flottantes, appelées neurosphères. La N-cadhérine est nécessaire pour maintenir les contacts intercellulaires au sein de ces groupes de cellules et inhiber leur différenciation. Dès que les cellules neuronales sortent de ces clusters, l'expression de la N-cadhérine est diminuée et les cellules commencent leur différenciation (Yagita et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par des travaux réalisés par le laboratoire de Chenn. En effet l'inhibition de l'expression de la N-cadhérine par électroporation *in utero* de shRNA dirigés contre la N-cadhérine dans la SVZ induit une diminution de l'expression de la β-caténine, une différentiation prématurée et une augmentation de la migration des neurones corticaux vers la plaque corticale (Kollman et al., 2011). Ces résultats suggèrent que ce sont les précurseurs neuronaux qui forment eux-mêmes leur niche grâce aux interactions réalisées par la N-cadhérine qui stimule leur prolifération, les maintient dans un état indifférencié et qui est ensuite inhibée pour que les précurseurs puissent entamer leur migration et différenciation.

Dans le cerveau de souris KO pour l'αE-caténine (Lien et al., 2006) la voie de signalisation Hedgehog serait activée de manière anormale et induirait une diminution de l'apoptose. Toutefois l'effet observé pourrait être indépendant des cadhérines et uniquement dû à l'absence de l'αE-caténine. Le rôle des cadhérines et de leurs partenaires serait donc important pour la régulation de la prolifération cellulaire, cependant les mécanismes d'action pourraient diverger selon le contexte cellulaire et leur étude doit donc être approfondie.

3.2. Migration neuronale

Après leur naissance les précurseurs neuronaux migrent dans les différentes zones du cerveau où ils accomplissent leur fonction. La N-cadhérine semble être importante pour la migration radiale des précurseurs neuronaux où son endocytose est régulée par les Rab GTPases (Kawauchi et al., 2010). Le trafic de la N-cadhérine au sein du neurone en migration permettrait une bonne localisation de la molécule d'adhésion au niveau du cône de croissance et une diminution de son expression à la membrane plasmique à l'arrière de la cellule, facilitant son détachement.

Ce trafic intracellulaire serait contrôlé par des effecteurs de la voie reelin (Franco et al., 2011). Cette voie de signalisation est très importante dans le développement néocortical car des mutations affectant cette voie provoqueraient des lissencéphalies (maladies où le cerveau ne possède plus de scissures et apparaît lisse) ou encore une hypoplasie du cervelet (Hong et al., 2000). L'activation de la voie reelin stimulerait la protéine intracellulaire Dab1 qui par des mécanismes moléculaires peu connus contrôlerait la GTPase Rap1. Cette protéine Rap1 à son tour régulerait l'adhésion dépendante de la N-cadhérine (Franco et al., 2011) ainsi que sa localisation à la surface membranaire, nécessaire pour la polarisation correcte des neurones (Jossin and Cooper, 2011). L'un des facteurs qui stopperait la migration des neurones serait l'internalisation et la dégradation de la N-cadhérine par les voies lysosomales, permettant au neurone de se différencier dans la zone où il a arrêté sa migration (Kawauchi et al., 2010).

3.3. Croissance neuritique

La N-cadhérine a été initialement décrite comme molécule favorisant l'extension neuritique et axonale in vitro. Des travaux réalisés à partir d'explants de rétine d'embryon de poulet étalés sur des monocouches de cellules de lignées cellulaires transfectées avec ou sans N-cadhérine, ont montré que les axones poussaient beaucoup plus sur les cellules présentant la N-cadhérine à leur surface (Matsunaga et al., 1988). D'autres travaux ont montré par la suite que la N-cadhérine agissait comme stimulateur de la croissance axonale et ceci dans différents types de cellules neuronales (Marthiens et al., 2005; Nogales et al., 1998; Riehl et al., 1996). Aujourd'hui différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet stimulateur de l'adhésion N-cadhérine sur la croissance neuritique.

Des expériences *in vitro* utilisant des neurones d'hippocampe d'embryons de rat étalés sur des substrats biomimétiques de N-cadhérine, permettant l'engagement spécifique de la N-cadhérine, montrent que la motilité des cônes de croissance est stimulée par ce type d'adhésion (Bard et al., 2008; Thoumine et al., 2006). L'association des cadhérines au cytosquelette d'actine a été proposée comme le facteur principal responsable de la croissance neuritique dépendante de la N-cadhérine (Rôle de l'ancrage des cadhérines à l'actine, voir paragraphe 2.4.3.c du chapitre I). Cette hypothèse est illustrée par le modèle d'**embrayage moléculaire** (voir paragraphe 1.2. du chapitre I), proposant que le lien mécanique existant entre les cadhérines et l'actine permette l'avancée du cône de croissance. (figure 17A).

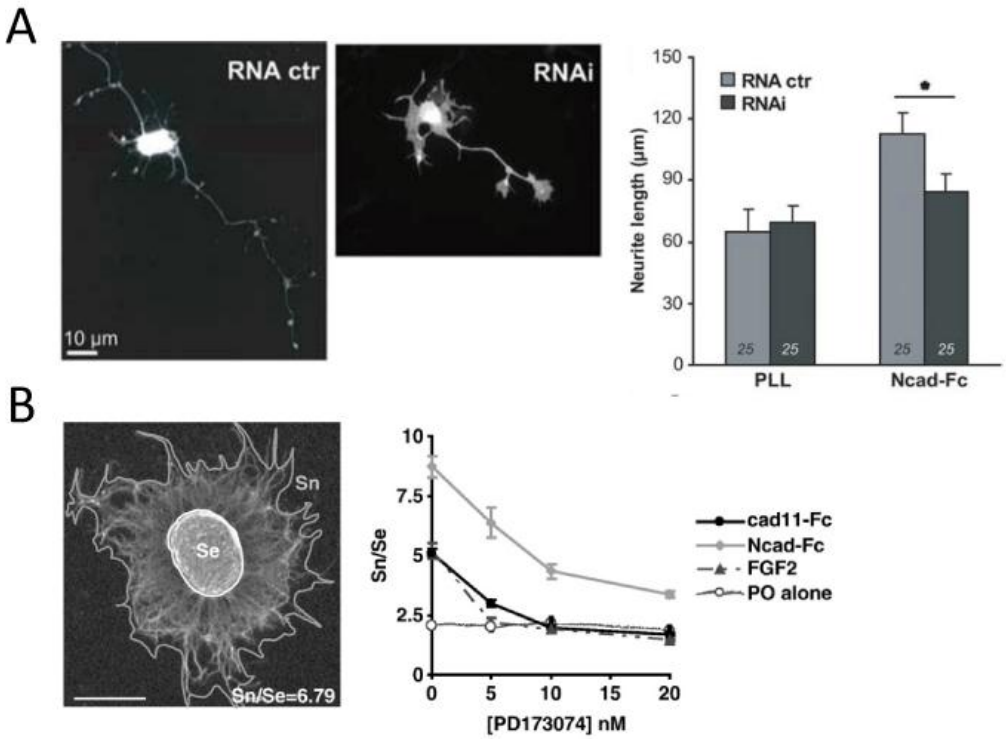


Figure 17 | **Stimulation de la croissance neuritique par la N-cadhérine : ancrage à l'actine et signalisation FGF.**

A: Lorsque des neurones d'hippocampe de rat sont étalés sur substrat N-cadhérine et transfectés avec des ARN interférents dirigés contre l'α-caténine (RNAi, Ncad-Fc), la longueur des neurites est diminuée de manière significative par rapport à des neurones transfectés avec un ARN interférent contrôle (RNA ctr, Ncad-Fc). Cet effet est bien spécifique de l'adhésion dépendante de la N-cadhérine étant donné que (i) sur substrat polylysine – laminine (RNA ctr, PLL) la croissance neuritique est moins forte que sur Ncad-Fc (RNA ctr, Ncad-Fc), et que (ii) l'extinction de l'expression de l'α-caténine ne modifie pas la croissance neuritique (RNAi, PLL). L'ancrage des cadhérines à l'actine effectué grâce à l'α-caténine entraîne donc une stimulation de la croissance neuritique. Tiré de (Bard et al., 2008).

B : Des explants de corde spinale ventrale de souris ont été étalés sur différents substrats et traités avec différentes concentrations d'inhibiteur du récepteur au FGF1 –FGFR1- (PD173074). La croissance neuritique a été mesurée grâce au ratio de la surface des extensions neuritiques (Sn) sur la surface du corps de l'explant (Se) : Sn/Se. L'adhésion des explants sur des substrats de N-cadhérine (Ncad-Fc) ou encore de cadhérine-11 (cad11-Fc), ainsi que l'ajout de FGF2 dans le milieu entraînent une augmentation de la poussée neuritique en comparaison avec des explants sur poly-ornithine (PO). L'inhibition du FGFR1 inhibe cette stimulation de la croissance neuritique. L'interaction du FGFR1 avec les cadhérines N et 11 constituerait donc une autre voie de signalisation impliquée dans la croissance neuritique. Adapté de (Boscher and Mege, 2008).

Une voie de signalisation alternative participant à la stimulation de la croissance neuritique par la N-cadhérine a été indentifiée impliquant l'association de la N-cadhérine avec avec le **récepteur au FGF1** (FGFR1). En effet des travaux réalisés dans le laboratoire de Doherty ainsi que dans notre équipe suggèrent que la N-cadhérine interagirait au niveau de son domaine extracellulaire avec le **récepteur au FGF1** (FGFR1) (Boscher and Mege, 2008; Williams et al., 1994; Williams et al., 2001). Cette interaction déclencherait les cascades de signalisation DAG lipase/CAM kinase et PI3K/Akt menant à une croissance neuritique accrue (figure 17B). Un autre récepteur s'associant avec la N-cadhérine est le **récepteur Robo**. Robo est un récepteur de Slit, une molécule de guidage axonale répulsive. Le récepteur Robo interagirait avec le complexe adhésif après la liaison de Slit, provoquant la phosphorylation de la β-caténine par

l'intermédiaire de la kinase Abl. La β-caténine se dissocierait de la N-cadhérine, induisant une perte de l'adhésion (Rhee et al., 2002) et (Rhee et al., 2007). L'association N-cadhérine/Robo est donc proposée, à l'inverse du FGFR1, comme inhibitrice de la croissance neuritique.

Nous avons pu voir au cours de ce chapitre comment les récepteurs d'adhésion de la famille des cadhérines interagissent entre eux et par quels mécanismes moléculaires ils pouvent s'associer au cytosquelette d'actine. L'ancrage des cadhérines à l'actine est une étape essentielle pour pouvoir établir et réguler les contacts intercellulaires, ces contacts étant notamment très importants au cours de la mise en place du système nerveux. Cependant les cadhérines peuvent établir des liens également avec le réseau de microtubules et dans le chapitre suivant nous allons décrire ces microtubules.

Chapitre II: Les Microtubules

Les cadhérines sont mieux connues pour leur relation avec le cytosquelette d'actine. Cependant, de plus en plus d'études mettent en avant un lien fonctionnel entre ces récepteurs d'adhésion et le réseau de microtubules. Le cytosquelette de microtubules est d'une importance critique dans la vie des cellules, permettant le transport intracellulaire, le positionnement des organelles, la division cellulaire et la migration cellulaire. Dans ce chapitre nous nous intéresserons aux mécanismes régulant l'assemblage et la dynamique des microtubules.

1. Structure et assemblage des microtubules

Les microtubules sont des polymères polarisés de très grande instabilité dynamique capables de passer de manière stochastique d'une phase de croissance à une phase de raccourcissement (Mitchison and Kirschner, 1984). Les conversions de croissance à raccourcissement sont appelées les phénomènes de catastrophe et les conversions de raccourcissement à croissance les phénomènes de sauvetage. Ces cycles de croissance/raccourcissement sont observés à la fois *in vitro* et *in vivo* (Nogales, 2001) et *in vitro* les extrémités (+) sont plus dynamiques que les extrémités (-). En règle générale, dans la cellule les extrémités (-) des microtubules sont ancrées au centrosome et les extrémités (+) sont orientées vers la périphérie de la cellule. Cependant l'organisation du réseau de microtubules peut varier selon le type cellulaire. Par exemple dans les cellules épithéliales et neuronales il peut exister un sous-ensemble de microtubules non ancrés au centrosome et possédant une organisation spécifique (Keating and Borisy, 1999) :

- Dans les cellules épithéliales ces microtubules non centrosomaux sont alignés le long de la paroi apico-latérale avec leur extrémité (-) dirigée vers le pôle apical (Bacallao et al., 1989).
- Dans les cellules neuronales les microtubules non ancrés au centrosome dans les dendrites sont orientés avec leurs bouts (+) ou (-) vers l'extrémité neuritique tandis que dans les axones les microtubules possèdent tous la même polarité avec leur extrémité (+) vers le cône de croissance (Conde and Caceres, 2009).
- Lorsque les myoblastes se différenciant en myotubes, les microtubules sont dissociés du centre organisateur de microtubules et alignés parallèlement à la membrane plasmique (Tassin et al., 1985a).

1.1. Structure des microtubules

Les microtubules sont des tubes creux de diamètre externe de 25nm avec une lumière large de 15nm. Ils sont composés de tubuline (Amos and Klug, 1974). Les sous-unités de tubuline forment in vitro des protofilaments linéaires qui s'associent de manière parallèle afin de créer au final le microtubule (figure 18). Les microtubules peuvent contenir *in vitro* 11 à 16 protofilaments (Chretien and Wade, 1991) mais *in vivo* ils en possèdent généralement 13. La

structure hélicoïdale des microtubules se ferme au niveau d'un sillon (le « seam »), dû à un léger décalage des interactions latérales des tubulines (Mandelkow et al., 1986).

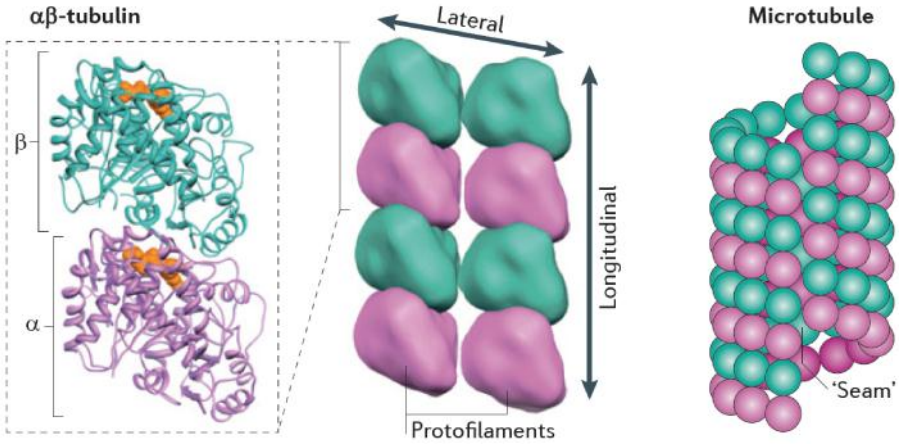


Figure 18 | Structure et assemblage des tubulines α et β.
Les hétérodimères de tubuline α et β sont incorporés dans les protofilaments lorsqu'ils sont liés au GTP (en orange sur le panneau à gauche). Ils réalisent des interactions longitudinales (interactions α –β) et latérales (α-α et β-β) (panneau au centre). La structure hélicoïdale des microtubules est fermée par un sillon (« seam », panneau à droite). Adapté de (Kollman et al., 2011).

Les hétérodimères de tubulines α/β, généralement désignés sous le terme générique de tubuline sont les briques élémentaires des microtubules, elles sont très similaires entre elles et sont très conservées au sein des différentes espèces chez les Eucaryotes. Ces tubulines possèdent différents isotypes (Villasante et al., 1986; Wang et al., 1986) mais il existe des isoformes de tubulines particulières (Dutcher, 2001; Inclan and Nogales, 2001; McKean et al., 2001) : la γ-tubuline qui joue un rôle dans l'initiation de l'assemblage des microtubules au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC : microtubule organizing center), les δ et ε-tubulines qui sont localisées au centrosome, la ζ-tubuline qui est située au niveau du corps basal chez le trypanosome (*Trypanosoma brucei*) et la η-tubuline dont la localisation et la fonction ne sont pas encore connues.

1.2. Assemblage des hétérodimères de tubuline α/β

L'assemblage des hétérodimères de tubulines α/β est co-traductionnel, extrêmement stable et précède leur incorporation au sein du microtubule en cours d'élongation. L'association des tubulines α et β nécessite l'intervention de toute une série de chaperonnes dans une voie de repliement relativement complexe (Lewis et al., 1997) (figure 19). Les polypeptides de tubulines α et β en cours de synthèse sont capturés et stabilisés par la préfoldine (PFD) qui joue le rôle de navette et les délivre à la chaperonne CCT (Chaperonin containing TCP-1). La protéine CCT génère des intermédiaires de repliement après plusieurs cycles d'hydrolyse d'ATP qui ensuite vont interagir avec différents cofacteurs, les protéines TBC (Tubulin cofactor) A à E. Les

cofacteurs B et E et les cofacteurs A et D prennent en charge respectivement les tubulines α et β, les protéines TBCB et TBCA servant de « réservoirs » de tubulines aux deux autres cofacteurs. Les complexes TBCE/tubuline α et TBCD/tubuline β convergent et forment un super complexe transitoire en association avec TBCC, le cofacteur C permettant de rendre l'hétérodimère α/β compétent pour l'intégration dans le microtubule (Nogales, 2001; Szolajska and Chroboczek, 2011).

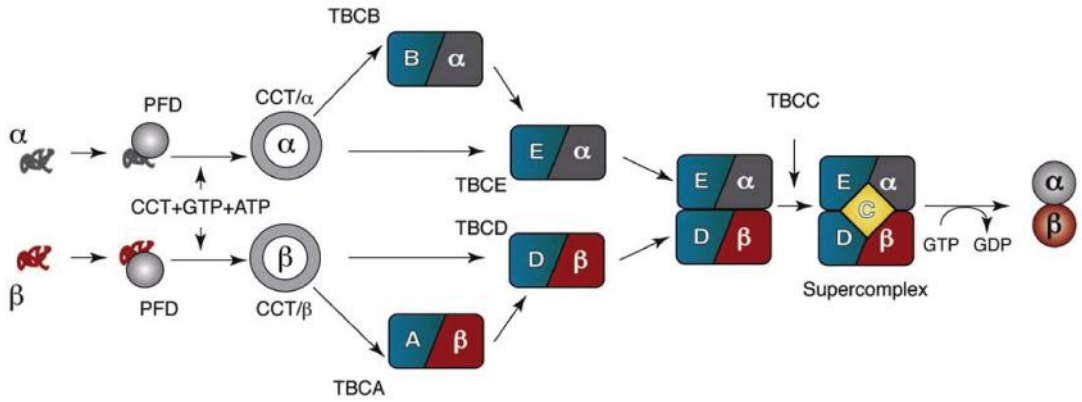


Figure 19 | Voies de repliement des tubulines α et β.
Tiré de (Jaglin and Chelly, 2009).

1.3. Formation des protofilaments

Les hétérodimères α/β sont ensuite incorporés par une association en tête-à-queue dans le protofilament en cours d'élongation. Pour cela les tubulines α et β interagissent longitudinalement le long du protofilament en formation (interactions α-β) et latéralement pour joindre les différents protofilaments (interactions α-α et β-β) (figure 18).

Les tubulines α et β possèdent trois domaines fonctionnels (Nogales et al., 1998) :
- Le **domaine amino-terminal** est le site de liaison au nucléotide GTP ou GDP. Le site de liaison pour le nucléotide de la tubuline β est appelé site E (E pour site échangeable). En raison de l'activité hydrolase de la tubuline β ainsi que de l'exposition partielle de ce site E à la surface du dimère α/β, la molécule de GTP peut être hydrolysée en GDP. Inversement, ce GDP peut être échangé par une molécule de GTP. La sous-unité de tubuline α quant à elle ne peut pas hydrolyser le nucléotide de GTP lié à son site N (N pour non échangeable) qui est enfoui à l'interface intradimérique.
- Le **domaine intermédiaire** est impliqué dans la polymérisation du microtubule en contribuant aux associations longitudinales au sein du protofilament et aux associations latérales entre les différents protofilaments.
- Le **domaine carboxy-terminal** est exposé en grande partie à l'extérieur du microtubule, formant une crête continue le long du protofilament (Nogales et al., 1999). Ce domaine est le site d'interaction des tubulines avec les protéines associées aux microtubules, les MAP (microtubule

associated proteins) et les moteurs moléculaires se déplaçant le long des microtubules telles que les dynéines et les kinésines.

Les dimères α/β liés au GTP s'insèrent à l'extrémité (+) des microtubules selon une cinétique plus rapide qu'à l'extrémité (-). Une fois au sein du polymère de microtubule, le GTP de la sous-unité β est hydrolysé en GDP + Pi. Le site E devient alors à son tour inaccessible et bloque la tubuline β dans un état lié au GDP. Enfin le Pi est relargué, menant à des microtubules ainsi essentiellement composés de tubuline β/GDP.Cette réaction est associée à une transition du dimère α/β d'une structure rectiligne à une structure légèrement courbe rendant favorable sa dissociation du microtubule (figure 20). (Carlier et al., 1988; Panda et al., 2002).

Cependant l'incorporation des dimères α/β liés au GTP à l'extrémité + du microtubule n'est pas suivie immédiatement de l'hydrolyse du GTP. La conformation plus droite de ce dimère GTP (à l'inverse du dimère GDP) favorise la stabilité des contacts latéraux entre les protofilaments (Wang and Nogales, 2005). Le léger décalage entre l'incorporation des tubulines et l'hydrolyse du GTP génère une coiffe de GTP à l'extrémité (+) du microtubule (figure 20) (Caplow and Shanks, 1996; Desai and Mitchison, 1997; Drechsel and Kirschner, 1994).

L'hydrolyse du GTP n'est pas nécessaire au processus de polymérisation mais est essentielle pour créer l'instabilité dynamique du microtubule (Hyman et al., 1992). En effet quand le polymère perd sa coiffe de GTP, le microtubule est déstabilisé et se dépolymérise en dissociant ses protofilaments les uns des autres et en libérant des hétérodimères de tubuline α/β (figure 20). Grischuk et collaborateurs ont mesuré la force exercée par un protofilament « s'arrachant » du microtubule et ont estimé qu'elle serait 10 fois plus grande que celle d'un moteur kinésine (Grishchuk et al., 2005). Ils ont ainsi émis l'hypothèse que l'énergie issue de l'hydrolyse serait emmagasinée dans le feuillet de microtubule et relâchée au cours de la dépolymérisation.

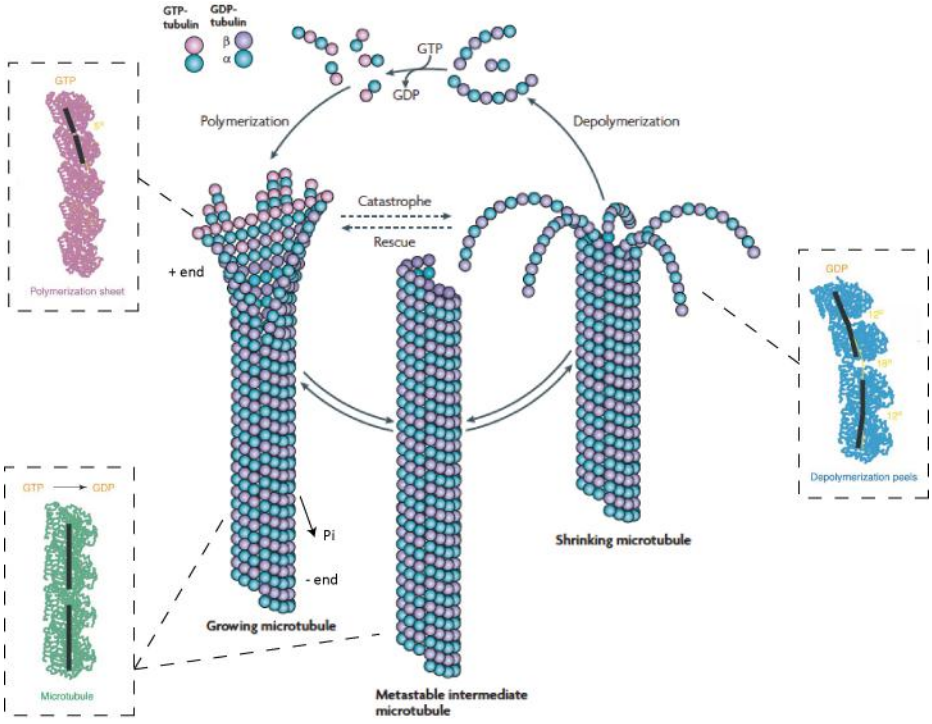


Figure 20 | Mécanismes de polymérisation/dépolymérisation des microtubules.
L'incorporation des hétérodimères α/β en tête-à-queue dans le microtubule est orientée avec la sous-unité de tubuline β vers l'extrémité (+) du microtubule (qui polymérise plus vite *in vitro* que l'extrémité (-)) et la sous-unité α vers l'extrémité (-). A cette étape d'association à l'extrémité du feuillet, les hétérodimères sont tous deux liés au GTP et possèdent une structure relativement courbée (encadré avec les tubulines en rose). Ensuite la fermeture du feuillet de microtubule est réalisée grâce aux associations latérales entre les tubulines et est accompagnée de l'hydrolyse du GTP en GDP+Pi (pour phosphate inorganique) de la sous-unité β. Cette interaction latérale entre les protofilaments et l'hydrolyse du GTP sont traduites par une structure rectiligne des hétérodimères α/β (encadré avec les tubulines en vert). Suite au relargage du Pi la structure de l'hétérodimère α/β devient courbe et favorise leur dissociation du microtubule (encadré avec les tubulines en bleu). L'association des hétérodimères α/β liés au GTP induit la formation d'une coiffe GTP à l'extrémité plus du microtubule en cours d'élongation. La perte de cette coiffe déstabilise le microtubule qui dépolymérise très rapidement en dissociant les dimères de tubulines liés au GDP. Adapté de (Conde and Caceres, 2009; Nogales and Wang, 2006).

Les événements de catastrophe les microtubules sont suivis de phases de sauvetage apparemment stochastiques. Le laboratoire de Franck Perez a proposé en 2008 un modèle expliquant la survenue des évènements de sauvetage, basé sur la découverte de vestiges de tubuline de conformation tubuline-GTP résidant dans le microtubule polymérisé (Dimitrov et al., 2008). Grâce à un anticorps reconnaissant la conformation de la tubuline liée au GTP, ils ont pu mettre en évidence que de la tubuline de conformation tubuline-GTP n'était pas présente uniquement au niveau de l'extrémité (+) mais qu'il en subsistait à certains endroits le long des microtubules, même après hydrolyse du GTP. Ils ont également constaté que les événements de sauvetage survenaient à partir de ces vestiges de tubuline-GTP. Les travaux de Dimitrov et collaborateurs ont ainsi suggéré que ces vestiges de GTP seraient exposés après dépolymérisation et se comporteraient comme des coiffes de GTP, promouvant les événements de sauvetage.

1.4. La nucléation des microtubules

Comme décrit précédemment, les microtubules sont des structures subissant des cycles de polymérisation/dépolymérisation principalement à l'extrémité (+). Cependant les mécanismes structuraux permettant leur nucléation sont encore sujets à débats. La nucléation *in vitro* des microtubules est un processus spontané mais lent. En effet l'assemblage des tubulines sans nucléateurs est une condition défavorable énergétiquement et il faudra plusieurs étapes avant que l'oligomère formé soit suffisamment conséquent pour être favorable énergétiquement, menant à une croissance rapide du microtubule (Rice et al., 2008). La nucléation des microtubules *in vivo* est différente car les cellules possèdent des centres nucléateurs de microtubules (MTOC Microtubule organizing center) évitant les étapes initiales lentes de la polymérisation spontanée. Dans les cellules animales le MTOC est en général associé au centrosome. Le centrosome est constitué de deux centrioles perpendiculaires (eux-mêmes formés chacun de 9 triplets de microtubules) entourés de matériel péricentriolaire, sur lequel est ancrée une cinquantaine de complexes de nucléation contenant de la γ-tubuline.

La γ-tubuline, protéine ubiquitaire chez les eucaryotes et homologue des tubulines α et β, est une protéine qui n'est pas incorporée dans le microtubule mais reste localisée au niveau du centrosome. Lorsque la γ-tubuline est purifiée, elle est retrouvée complexée avec les protéines GPC 2 à 6 (gamma-tubuline protein complex 2-6) et des observations au microscope électronique mettent en évidence une morphologie ressemblant à un anneau (Zheng et al., 1995). Ce complexe formé de la γ-tubuline et des protéines GPC est dénommé γ-TuRC (γ-Tubulin ring complex) (figure 21). I*n vitro*, l'ajout des protéines du complexe γ-TuRC à de la tubuline présente dans des conditions ne favorisant pas sa polymérisation spontanée induit la formation de microtubules (Oegema et al., 1999). Le complexe γ-TuRC nuclée donc directement les microtubules, cependant le mécanisme de nucléation est encore débattu. A ce jour deux modèles sont proposés (figure 21) (Erickson, 2000; Kollman et al., 2011) :
- Le « modèle de matrice » (template model) : les γ-tubulines du complexe γ-TuRC formeraient un anneau en établissant des contacts latéraux entre elles et des contacts longitudinaux avec l'α-tubuline.
- Le « modèle du protofilament » (protofilament model) : le complexe γ-TuRC serait déroulé et les γ-tubulines établiraient des contacts longitudinaux entre elles pour former le début d'un protofilament et elles réaliseraient des contacts latéraux avec les tubulines α et β.
Les contacts longitudinaux entre γ-tubulines seraient plus forts que leurs contacts latéraux, de plus il a été démontré que les γ-tubulines étaient capables structuralement d'établir des contacts latéraux entre elles (Aldaz et al., 2005). Ces données favoriseraient le premier modèle de nucléation avec la formation d'un anneau de γ-tubuline, créant une matrice pour les tubulines α et β.

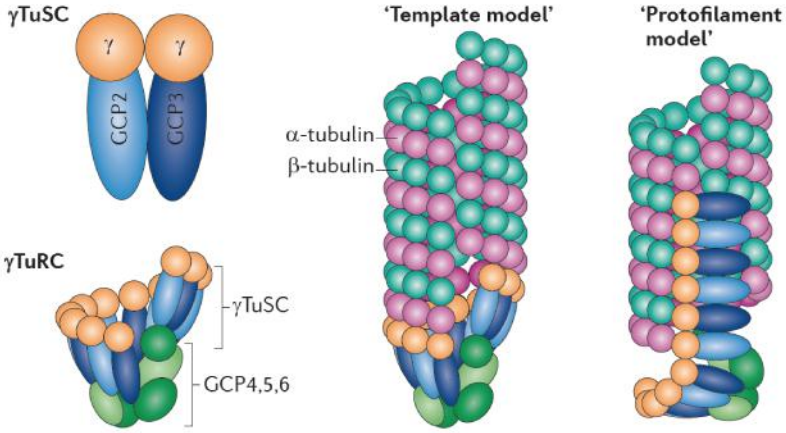


Figure 21 | Composition du γ-TuRC et modèles de nucléation des microtubules.
Le cœur du complexe de nucléation des microtubules est constitué par le γ-TuSC (γ-tubulin smal complex) qui est composé de deux γ-tubulines et d'une GCP2 et une GCP3 (γ-tubulin complex protein 2 – 3). Plusieurs γ-TuSC s'associent avec des GCP4, 5 et 6 formant ainsi le γ-TuRC. Ce γ-TuRC permet la nucléation des microtubules selon deux modèles encore débattus : le modèle de matrice (« template model ») et le modèle du protofilament (« protofilament model »). Adapté de (Kollman et al., 2011).

Le complexe γ-TuRC est nécessaire à la nucléation des microtubules mais il n'est pas suffisant et nécessiterait la **ninéine**. En effet la ninéine permet l'ancrage de l'extrémité (-) des microtubules au niveau du γ-TuRC et permettrait également l'association du complexe γ-TuRC au centrosome, promouvant ainsi la nucléation des microtubules (Delgehyr et al., 2005) (Delgehyr et al., 2005). Cependant la ninéine n'agirait pas uniquement au niveau du centrosome, elle pourrait en être relarguée (Moss et al., 2007) et se localiser aux jonctions adhérentes afin d'y stabiliser leur extrémité (-) et/ou réguler la nucléation des microtubules (figure 33B) (Bellett et al., 2009).

La nucléation des microtubules peut également avoir lieu ailleurs qu'au centrosome, comme par exemple au niveau de l'appareil de Golgi dans des myoblastes en différenciation (Tassin et al., 1985b). Dans le cas des cellules S2 de drosophile, la nucléation est réalisée au niveau de plusieurs petits sites de nucléation (Rogers et al., 2008), créant un réseau de microtubules non ancrés à une structure de type centrosome.

2. Régulation de la dynamique des microtubules

L'instabilité dynamique des microtubules leur permet d'explorer l'espace intracellulaire et de réguler des processus tels que le transport intracellulaire, la division cellulaire, la morphologie et la motilité cellulaires. Les microtubules doivent donc évoluer constamment, cependant les mécanismes par lesquels ils s'adaptent sont différents selon leur environnement subcellulaire sous l'effet de divers facteurs pouvant réguler leur dynamique.

2.1. Modifications post-traductionnelles des tubulines

Les microtubules peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles telles que la tyrosination, la détyrosination, la transformation Δ2, l'acétylation, la polyglutamylation, la polyglycylation, la phosphorylation et la palmitoylation (Janke and Bulinski, 2011). Ces nombreuses modifications sont supposées être importantes dans la spécification des rôles des microtubules et réguler leur dynamique ainsi que le recrutement de protéines associées. Bien que de nombreuses études commencent à clarifier la fonction précise de ces modifications post-traductionnelles, il reste encore beaucoup de points à éclaircir.

2.1.1. La tyrosination, la détyrosination, la transformation Δ2

Les modifications post-traductionnelles de tyrosination, détyrosination et de transformation Δ2 ont lieu sur l'α-tubuline, à l'extrémité du domaine carboxy-terminal qui est exposé sur la surface externe du microtubule (figure 22).

La plupart des gènes de la tubuline α codent pour une protéine portant une tyrosine en dernière position du domaine carboxy-terminal (Valenzuela et al., 1981). Les cycles de tyrosination/détyrosination démarrent par la suppression de cette tyrosine. La détyrosination est un processus réalisé au sein du microtubule polymérisé (Kumar and Flavin, 1981) par des tyrosine carboxypeptidases qui n'ont pas été encore identifiées. La sous-unité de tubuline α détyrosinée est appelée « tubuline Glu » car le dernier résidu exposé est un acide glutamique (Gundersen et al., 1984) ; à ne pas confondre avec la tubuline glutamylée qui représente une tubuline avec un autre type de modification post-traductionnelle.

Ce processus de détyrosination est réversible grâce à l'ajout d'une tyrosine (processus de tyrosination) par une tubuline tyrosine ligase (TTL) agissant sur des dimères α/β solubles (Raybin and Flavin, 1977). Les souris knock-out (KO) pour l'enzyme TTL meurent quelques heures après leur naissance suite à des anomalies développementales, présentant notamment une perturbation de la boucle thalamo-corticale dans le cerveau ainsi que des défauts de croissance neuritique (Erck et al., 2005; Marcos et al., 2009). La formation d'un réseau de microtubules contenant uniquement de la tubuline détyrosinée empêcherait le désassemblage des microtubules par les enzymes de dépolymérisation telles que les kinésines MCAK (mitotic centromere associated kinesin) et KIF2A (Peris et al., 2009). La tubuline α tyrosinée possède

également à son extrémité carboxy-terminale le motif EEY qui est reconnu par les protéines à domaines riches en glycine, les protéines CAP-Gly (Cytoskeleton associated proteins glycin rich) (pour revue (Akhmanova and Steinmetz, 2008) et voir paragraphe Ch.II 2.2.e). Les protéines CAP-Gly possèdent un rôle régulateur de la dynamique des microtubules. L'étude des souris KO pour la TTL a révélé que la suppression de microtubules tyrosinés empêchait la bonne localisation de ces protéines (Erck et al., 2005; Peris et al., 2006), entrainant des anomalies du fuseau mitotique ou encore de la croissance neuritique. La tubuline α tyrosinée constituerait donc un site de reconnaissance de protéines importantes dans la régulation de la dynamique des microtubules.

Une fois la tubuline α détyrosinée, elle pourrait sortir du cycle de tyrosination/détyrosination par clivage de l'acide glutamique qui précède la tyrosine via l'action de déglutamylases (Paturle-Lafanechere et al., 1991). La tubuline α est ainsi convertie de manière irréversible en tubuline Δ2, ce qui stabiliserait les microtubules de manière permanente.

2.1.2. L'acétylation

L'acétylation est la seule modification post-traductionnelle à ne pas être localisée à l'extrémité carboxy-terminale de la tubuline α. En effet le groupement acétyle ajouté au niveau de la lysine 40 de la tubuline α (L'Hernault and Rosenbaum, 1985) est situé dans la lumière du microtubule (figure 22). Le transfert du groupement acétyle sur la lysine 40 est effectué par différentes acétyl transférases : ARD1-NAT1 (arrest-defective 1-amino-terminal α-amino acetyl tranferase 1), le complexe ELP (Elongator protein complex), GCN5 (general control of amino acid synthesis) et αTAT1 (α tubulin N-acetyl transferase 1) (Conacci-Sorrell et al., 2010; Creppe et al., 2009; Ohkawa et al., 2008). La désacétylation est effectuée par deux enzymes : HDAC6 (histone deacetylase 6) (Hubbert et al., 2002) et SIRT2 (sirtuin2) (North et al., 2003). Ces deux enzymes homologues des enzymes histones HDAC agissent sur la tubuline α ainsi que sur d'autres substrats, mais pas sur les histones.

Cette modification post-traductionnelle est associée à la stabilité des microtubules, cependant peu de preuves expérimentales existent à ce jour. La surexpression de l'enzyme HDAC6 provoque une diminution de la quantité globale de microtubules acétylés et augmente la sensibilité des microtubules aux drogues dépolymérisantes (Matsuyama et al., 2002). L'acétylation serait donc nécessaire à la protection des microtubules. D'autres études suggèrent que l'acétylation des microtubules axonaux permettraient l'association de la protéine Tau, une autre MAPs (voir Chapitre II paragraphe 2.2.4), qui les protégerait d'une fragmentation par la katanine (enzyme de fragmentation des microtubules, voir Chapitre II paragraphe 2.2.3) (Qiang et al., 2006; Sudo and Baas, 2010). Une hypothèse pouvant expliquer l'influence de l'acétylation est qu'elle pourrait induire un changement de conformation des hétérodimères α/β, impactant sur la structure globale du microtubule. Cela permettrait de réguler l'association de protéines aux microtubules, malgré sa localisation luminale, et ainsi réguler la dynamique des microtubules.

2.1.3. La polyglutamylation et la polyglycylation

La polyglutamylation et la polyglycylation sont des modifications post-traductionnelles pouvant affecter les tubulines α et β. Elles consistent en l'ajout de plusieurs résidus d'acide glutamique (polyglutamylation) ou de glycine (polyglycylation) sous forme de chaînes plus ou moins longues sur des résidus d'acide glutamique de l'extrémité carboxy-terminale des tubulines (Edde et al., 1990; Redeker et al., 1994) (figure 22). Ces modifications post-traductionnelles sont réalisées par des enzymes de la famille TTLL (TTL-like) regroupant à la fois des enzymes de glutamylation et de glycylation. La suppression de ces chaînes d'acide glutamique et de glycine est catalysée par les enzymes de la famille des carboxypeptidases. La polyglutamylation est une modification majeure de la tubuline dans le cerveau dans lequel les enzymes régulatrices de cette modification ont été découvertes (Audebert et al., 1993).

L'ajout de ces chaînes d'acide glutamique ou de glycine provoque un apport de plusieurs charges négatives à la surface des microtubules et pourrait ainsi réguler l'association d'autres protéines. Par exemple la polyglutamylation a été décrite comme nécessaire pour la liaison du moteur dynéine sur les microtubules (Mitchell, 2010; Raff et al., 2008) ou encore permettre l'action de la katanine (Sharma et al., 2007) (description au paragraphe 2.2.3. de ce chapitre II) et de la spastine (Lacroix et al., 2010).

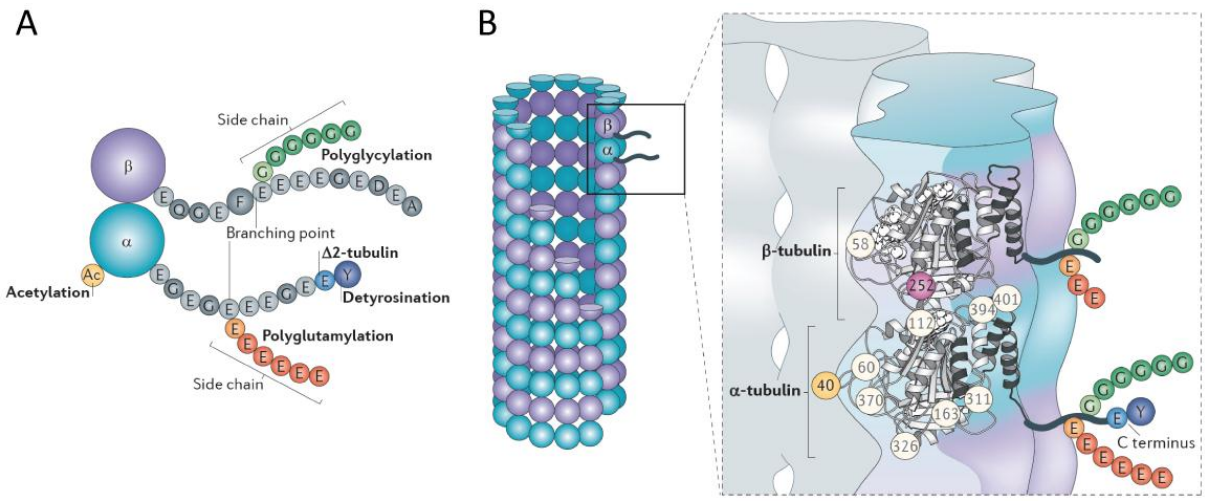


Figure 22 | Les différentes modifications post-traductionnelles des tubulines et leur localisation.
A : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles des tubulines α/β. Le domaine carboxy-terminal des tubulines est représenté par la séquence d'acides aminés, sur laquelle sont indiquées les différentes modifications post-traductionnelles. Les polyglycylations et polyglutamylations peuvent être présentes sur les tubulines α et β tandis que la détyrosination et la modification Δ2 sont spécifiques à l'α-tubuline. L'acétylation elle aussi est spécifique à l'α-tubuline mais l'ajout du groupement acétyle est effectué sur la lysine 40 du côté amino-terminal. **B :** Dans l'encadré à droite est représenté un montage entre la structure cristallographique des dimères α/β et la structure du microtubule après reconstruction d'observation en microscopie électronique. L'extrémité carboxy-terminale des tubulines est localisée à la surface des microtubules et est donc accessible aux protéines associées aux microtubules. L'acétylation de la tubuline α sur sa lysine 40 est quant à elle exposée à la lumière du microtubule. Adapté de (Janke and Bulinski, 2011).

Bien que les rôles des modifications post-traductionnelles des tubulines α et β ne soient pas encore bien établis, elles joueraient une fonction importante dans le changement de conformation du microtubule ou encore dans l'association de protéines régulant les microtubules.

2.2. Les protéines associées aux microtubules

La dynamique des microtubules est régulée par des protéines qui interagissent directement ou indirectement avec les microtubules. Ces protéines, que nous avons commencées à introduire dans le paragraphe précédent, permettent de réguler les processus de polymérisation/dépolymérisation, ou encore de fragmenter et de stabiliser le réseau de microtubules (figure 23). Pour revues : (Akhmanova and Steinmetz, 2008Akhmanova and Steinmetz, 2008; Neukirchen and Bradke, 2011b; Poulain and Sobel, 2010).

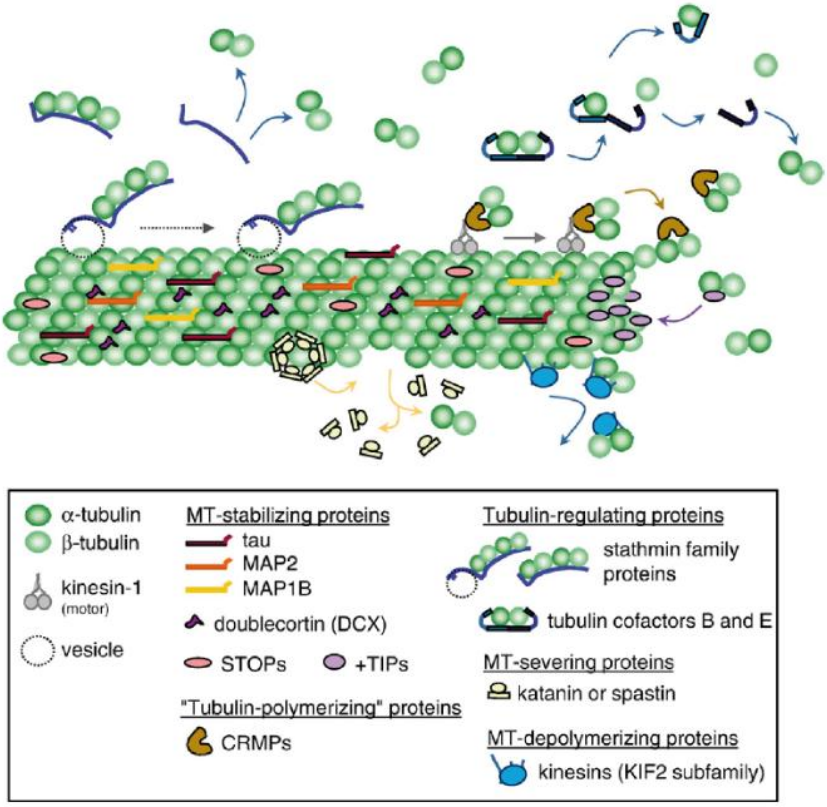


Figure 23 | Les différentes protéines associées aux microtubules.
Les protéines associées aux microtubules sont réparties ici en fonction de leur fonction. Les protéines permettant de **stabiliser** les microtubules représentées sont les MAP classiques, comprenant les MAP (ici MAP2 et MAP1B) et les protéines Tau, la doublecortine et les protéines associées aux extrémités (+) (+TIPs) et (-) (non représentées sur ce schéma).Les protéines **régulant la polymérisation** sont les protéines CRMP, les co-facteurs B et E et j'ai également rajouté dans ce groupe dans le texte ci-dessous les protéines de la famille de la stathmine qui régulent la disponibilité des tubulines libres pour la polymérisation en les séquestrant. Les protéines entraînant la **dépolymérisation** des microtubules sont les kinésines de la famille KIF. Les protéines déclenchant la **fragmentation** des microtubules sont la katanine et la spastine. Tiré de (Poulain and Sobel, 2010).

2.2.1. Protéines régulant la polymérisation des microtubules

Nous avons vu précédemment que la polymérisation des microtubules dans la cellule était un processus consistant principalement en l'ajout d'hétérodimères de tubulines α et β à l'extrémité (+) des microtubules (voir Introduction Chapitre II paragraphe 1.3.). L'apport de ces dimères est notamment favorisé par la protéine **CRMP-2** (Collapsin response mediator protein-2), transportant les hétérodimères et co-polymérisant avec eux dans le microtubule (Fukata et al., 2002b). Cette protéine CRMP-2 s'accumule notamment au niveau de l'extrémité des axones naissants, avant la polarisation morphologique des neurones. L'expression d'un mutant dominant négatif ou la surexpression de la protéine CRMP-2 entraine respectivement des défauts de formation de l'axone et la génération d'axones multiples (Inagaki et al., 2001).

A l'inverse des protéines CRMP qui peuvent s'associer directement aux microtubules, d'autres protéines comme les protéines de la famille des **stathmines** peuvent réguler la disponibilité des tubulines pour la réaction de polymérisation. Les stathmines, découvertes en 1989 (Sobel et al., 1989), sont des protéines phospho-régulées et une hypothèse suggère que les stathmines séquestreraient et relargueraient les tubulines au niveau des sites de polymérisation des microtubules (Watabe-Uchida et al., 2006). Cette modulation de la disponibilité du pool de tubulines permet d'influencer de manière indirecte la dynamique des microtubules. L'inhibition ou l'expression de mutants non phosphorylables de membres de protéines de la famille de la stathmine induisent des malformations des cônes de croissance, une diminution de la croissance axonale (Poulain and Sobel, 2007; Suh et al., 2004) ou encore des anomalies d'arborisation dendritique (Poulain et al., 2008).

2.2.2. Protéines entraînant la dépolymérisation des microtubules

La dépolymérisation des microtubules est importante pour la régulation de leur dynamique car elle permet de libérer des tubulines pour d'autres processus de polymérisation. Par ailleurs, certains événements cellulaires, tels que le changement de direction du cône de croissance ou le désassemblage d'un contact, nécessitent une rétraction des microtubules afin de remodeler le cortex cellulaire.

Les protéines de la superfamille des **kinésines** (les **KIF**) sont des moteurs moléculaires qui se déplacent le long des microtubules grâce à leur activité ATPase (Hirokawa and Takemura, 2004). Elles permettent le transport de différents cargos d'une extrémité à l'autre des microtubules, comme par exemple la protéine CRMP-2. Cependant les membres de la superfamille kinésine-13 (par exemple KIF2A et MCAK) peuvent également induire la dépolymérisation des microtubules. En effet ces kinésines ciblent les extrémités (-) des microtubules et déclenchent le désassemblage du polymère grâce à leur activité ATPase (Desai et al., 1999; Newton et al., 2004).

2.2.3. Protéines de fragmentation des microtubules

La nucléation des microtubules au niveau du MTOC permet de générer des microtubules qui sont en général ancrés au centrosome. Cependant comme décrit dans l'introduction du paragraphe 1 de ce chapitre certaines cellules comme les cellules épithéliales et les neurones possèdent un réseau de microtubules non centrosomaux. Différents mécanismes existent pour générer ces microtubules grâce à l'intervention de protéines fragmentant les microtubules (figure 23) (pour revue (Sharp and Ross, 2012)).

Parmi les enzymes de fragmentation des microtubules, la **spastine** est une enzyme qui participe au branchement axonal en « coupant » des microtubules axonaux en plusieurs petits fragments, qui serviront à générer un branchement latéral (Yu et al., 2008). De manière similaire la **katanine** est une ATPase qui fragmente les microtubules, mais qui agit au niveau du centrosome et n'intervient pas dans le branchement axonal. Karabay et collaborateurs ont montré que l'inhibition de la katanine dans les neurones induisait une accumulation de microtubules au niveau du centrosome, accompagnée d'une augmentation de la longueur des microtubules. Ces enzymes de fragmentation de microtubules permettraient ainsi de réguler la longueur et le nombre de microtubules qui sont ensuite transportés aux endroits essentiels où ils vont pouvoir à nouveau s'allonger (modèle dit de « cut and run »).

2.2.4. Les protéines stabilisatrices des microtubules

La stabilisation des microtubules est un processus important permettant d'établir et de maintenir la morphologie cellulaire, et par exemple de consolider et de promouvoir la croissance des neurites au cours de la morphogenèse neuronale. Il existe un grand nombre de protéines stabilisant les microtubules : les MAP classiques, les protéines STOP, la doublecortine et les protéines associées aux extrémités (-) et (+) des microtubules.

a. Les MAP classiques

Les MAP (Microtubule associated proteins) classiques regroupent les protéines des familles MAP1, MAP2 et Tau. Ces protéines stabilisatrices s'associent sur toute la longueur du microtubule.

Les protéines **MAP1** (MAP1A, MAP1B, MAP1S) régulent la stabilisation des microtubules en créant des ponts entre les microtubules (Halpain and Dehmelt, 2006). Ces MAP sont présentes dans tout le neurone mais sont enrichies dans l'axone et son cône de croissance où elles régulent la croissance axonale (Black et al., 1994; Bush et al., 1996; Mansfield et al., 1991).

La famille des protéines **MAP2** comprend les différents membres MAP2A et B, spécifiques des neurones et accumulés dans le soma et les dendrites, et les membres MAP2C et D présents dans les neurones et les cellules gliales et distribués dans la cellule entière (Binder et al., 1984; Ferhat et al., 1994; Garner et al., 1988). Les protéines MAP2 stabilisent les microtubules, elles augmentent leur rigidité et promeuvent leur nucléation. L'inhibition de MAP2 empêche la croissance neuritique de neurones de l'hippocampe et du cervelet (Caceres et al., 1992;

Gonzalez-Billault et al., 2002) tandis que la surexpression de MAP2c dans une lignée de cellules de neuroblastomes N2a peut induire la formation de neurites (Dehmelt et al., 2003).

La famille **Tau** possède six isoformes (dans les neurones des mammifères) qui se lient aux microtubules et induisent leur stabilisation, leur assemblage et nucléation. L'inhibition de l'expression de la protéine Tau respectivement avant et après la polarisation neuronale empêche la formation et induit la perte de l'axone (Caceres and Kosik, 1990; Caceres et al., 1991). Ces expériences suggèrent donc un rôle pivot de la protéine Tau dans la mise en place et le maintien de l'axone.

b. Les protéines STOP

Les protéines STOP (Stable-Tubule-Only-Peptide) ont été dans un premier lieu découvertes comme des facteurs responsables de la stabilité des microtubules lors de traitements au froid ; une propriété non partagée par les MAP classiques (Bosc et al., 1996; Job et al., 1982). Les différents variants d'épissage N- (neuronal), E- (early) et F-STOP (fibroblastic), possèdent des structures, des propriétés de liaison et de stabilisation des microtubules qui sont différentes. Les protéines N- et E-STOP s'associent avec les microtubules à des températures physiologiques tandis que la F-STOP ne se lie aux microtubules qu'après une exposition des cellules au froid (Denarier et al., 1998). Ces protéines STOP semblent se lier préférentiellement aux microtubules stables (Guillaud et al., 1998; Slaughter and Black, 2003) et leur inhibition bloque la croissance neuritique en réponse au NGF (Nerve growth factor) (Guillaud et al., 1998). Cependant les souris déficientes en protéines STOP n'ont aucun défaut développemental et ne présentent des anomalies de plasticité synaptique et de comportements que tardivement (Andrieux et al., 2002; Eastwood et al., 2007; Fradley et al., 2005).

c. La doublecortine

La doublecortine (DCX) est une protéine dont la mutation entraîne une lissencéphalie, une maladie neurodéveloppementale sévère causée par des malformations corticales (des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). DCX se lie sur les microtubules au niveau de la jonction de quatre monomères de tubuline et induit le renforcement des interactions latérale et longitudinale des protofilaments (Moores et al., 2006), permettant de condenser les microtubules. La DCX est enrichie à l'extrémité des neurites en croissance et permet la stabilisation des microtubules à la base des cônes de croissance, nécessaire pour l'élongation du neurite et la formation de l'axone (Friocourt et al., 2003). L'invalidation du gène codant pour la DCX entraîne le branchement excessif des interneurones provenant de l'éminence ganglionnaire médiane, ainsi que des défauts de nucléokinèse (Kappeler et al., 2006), révélant l'importance de la DCX dans la morphologie neuronale ainsi que dans nucléokinèse.

d. Les protéines associées aux extrémités (-) des microtubules

Les protéines associées aux extrémités (-) des microtubules représentent une classe de protéines associées aux microtubules relativement peu étudiée en comparaison aux autres familles. Les protéines du complexe **γ-TuRC** sont reconnues comme constituant les centres nucléateurs des microtubules (voir paragraphe ChII 1.4.). Cependant chez la drosophile ces protéines pourraient également réguler la dynamique des microtubules. En effet Bouissou et collaborateurs ont pu observer dans des cellules de drosophile des spots de γ-tubuline présents le long des microtubules pouvant correspondre aux sites de pause ou de sauvetage des microtubules (Bouissou et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc un nouveau rôle de la γ-tubuline, pouvant réguler la dynamique des microtubules et limiter les événements de catastrophes.

Comme décrit dans le paragraphe 1.4. du chapitre II, la ninéine est une protéine également associée à l'extrémité (-) et permet leur ancrage au centrosome ou aux jonctions adhérentes des cellules épithéliales. De plus nous avions décrit que la nucléation dans des cellules de drosophile engendrait des microtubules non ancrés au centrosome. Plusieurs équipes ont cherché à comprendre comment les microtubules de ces cellules étaient protégés de la dépolymérisation au bout (-). Un criblage du génome entier par ARN interférents pour des défauts de morphologie du fuseau mitotique chez la drosophile a permis la découverte d'une nouvelle protéine des extrémités (-) (Goshima et al., 2007). L'inhibition de l'expression de cette protéine, appelée **patronine** par Goodwin et collaborateurs, n'a aucun impact sur la dynamique des extrémités (+) des microtubules mais induit une dépolymérisation plus rapide des microtubules par leur extrémité (-) (Goodwin and Vale, 2010). De plus l'inhibition simultanée de la patronine et des membres de la famille des kinésines 13 (voir Ch.II paragraphe 2.2.2) supprime ce phénotype, suggérant que la patronine est une protéine s'associant à l'extrémité (-) des microtubules, les protégeant de la dépolymérisation dépendante des kinésines 13 (figure 24) (Goodwin and Vale, 2010).

La patronine possède deux homologues chez les mammifères dont KIAA1543 (Goshima et al., 2007), appelé la protéine **Nezha** par Meng et collaborateurs (Meng et al., 2008). Cette protéine Nezha est localisée aux extrémités (-) des microtubules et au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales. Les travaux de Meng et collaborateurs ont pu mettre en évidence que cette protéine permet l'ancrage des microtubules non-centrosomaux par leur extrémité (-) aux jonctions adhérentes (Meng et al., 2008).

Les protéines associées aux extrémités (-) des microtubules possèdent donc des activités stabilisatrice et régulatrice des microtubules. Un criblage plus large pour rechercher de nouvelles protéines ainsi qu'une étude plus approfondie de cette classe de protéines seront importants pour comprendre pleinement les phénomènes de modulation de la stabilité des microtubules.

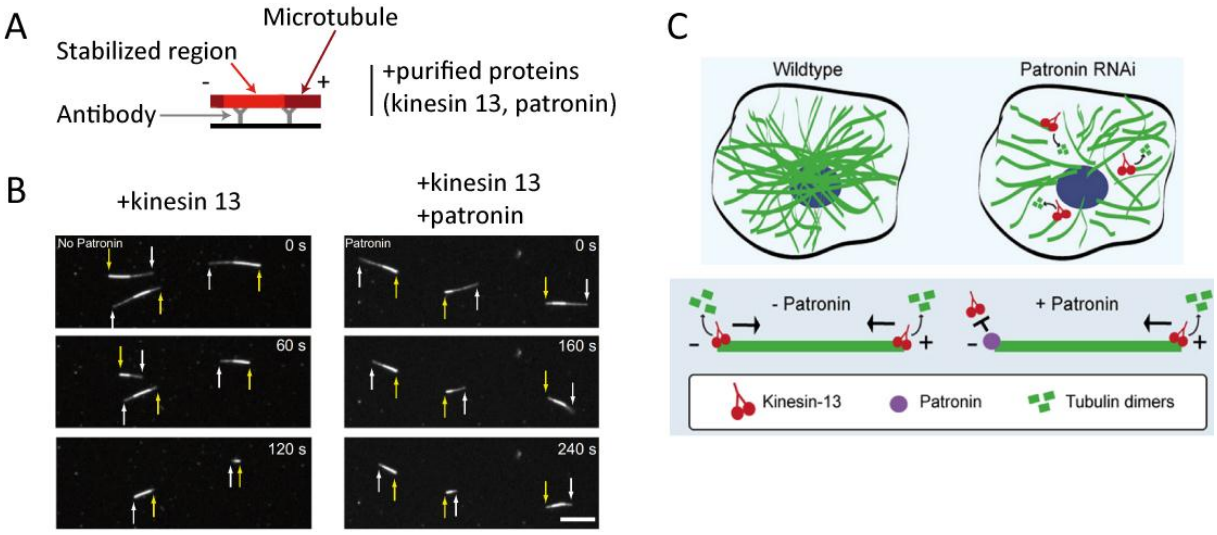


Figure 24 | Mise en évidence du rôle protecteur de la patronine.
Pour tester le rôle de la patronine, Goodwin et collaborateurs ont effectué entre autre des expériences de dépolymérisation des microtubules *in vitro*. **A :** Des microtubules marqués à la rhodamine avec une région stabilisée (GMP-CPP, la plus fluorescente) sont attachés à une lamelle par des anticorps anti-rhodamine. L'extrémité (-) de ces microtubules est la plus proche de la région de plus forte intensité de fluorescence. **B :** Sans patronine, la kinésine 13 dépolymérise les microtubules aux deux extrémités. Après ajout de la patronine la dépolymérisation n'a lieu qu'à l'extrémité (+) (flèches blanches) tandis que l'extrémité (-) est stable (flèches jaunes). Barre d'échelle 10µm. C : Schéma récapitulatif du rôle protecteur de la patronine au niveau de l'extrémité (-) des microtubules. Adapté de (Goodwin and Vale, 2010).

e. Les protéines associées aux extrémités (+) des microtubules

Les protéines associées aux extrémités (+) des microtubules (ou protéines +TIP) sont extrêmement étudiées, elles jouent un rôle important dans la régulation de la dynamique des microtubules et peuvent permettre leur ancrage à différentes structures cellulaires. La localisation exclusive à l'extrémité (+) des microtubules est due à leur haute affinité de liaison pour ces extrémités lors de leur croissance. Cette classe de protéines est composée de plusieurs familles que nous allons présenter ici (pour revue : (Akhmanova and Steinmetz, 2008)).

Les protéines CAP-Gly : protéines CLIP et p150^{Glued}

Les protéines CAP-Gly (cytoskeleton-associated protein glychin-rich) constituent une famille structurale regroupant des protéines possédant des domaines riches en glycine au niveau de leur extrémité amino terminale. Elles comprennent les protéines CLIP et p150^{Glued}. Les domaines riches en glycine forment une cavité hydrophobe leur permettant de reconnaître des motifs EEY/F (Honnappa et al., 2006; Mishima et al., 2007) contenus dans la tubuline α ainsi que dans d'autres protéines +TIP comme les protéines EB (End binding) (Bieling et al., 2008; Dixit et al., 2009).

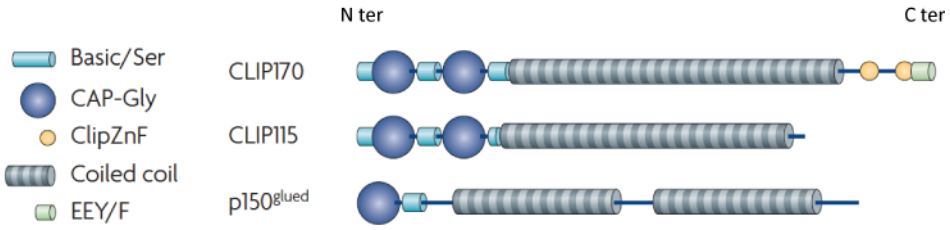


Figure 25 | Structure des protéines CAP-Gly.
Les protéines CAP-Gly possèdent à leur extrémité amino-terminale des domaines riches en glycines (CAP-gly), d'homologie à la calponine (CH : calponin homology) et riches en sérines (Basic/Ser). Leurs domaines « coiled-coil » leur permettent de se dimériser. CLIP-170 possède également des motifs en carboxy-terminal lui permettant de lier des ions zinc (impliqués dans des interactions protéine-protéine) et le motif EEY/F. La structure de CLIP-115 est très proche de celle de CLIP-170 mais ne possède pas son domaine carboxy-terminal. Adapté de (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Les protéines CLIP (cytoplasmic linker protein) comprennent les protéines **CLIP-170** et **CLIP-115**. CLIP-170 a été la première à avoir été identifiée comme protéine +TIP (Perez et al., 1999; Pierre et al., 1992). CLIP-170 est ubiquitaire tandis que CLIP-115 est essentiellement exprimée dans le cerveau et les muscles (De Zeeuw et al., 1997) et ne possède pas à l'inverse de CLIP-170 de motif de liaison aux ions zinc dans son domaine carboxy-terminal (Akhmanova and Steinmetz, 2008). La liaison des protéines CLIP nécessite la présence de la protéine +TIP EB1 à l'extrémité des microtubules (figure 25) (Bieling et al., 2008; Dixit et al., 2009).

La perturbation de la fonction de CLIP-170 dans des cellules CHO par expression d'un mutant sans domaine amino-terminal, donc ne pouvant plus lier les microtubules, induit une forte diminution de la fréquence de sauvetages ainsi que la perte de la protéine p150^{Glued} de l'extrémité des microtubules (Komarova et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la protéine CLIP-170 promeut les événements de sauvetage, soit en agissant en tant que facteur de sauvetage soit en recrutant d'autres protéines jouant ce rôle.

Neukirchen et collaborateurs ont exprimé dans des neurones d'hippocampe un fragment de l'extrémité carboxy-terminale qui est impliqué dans l'autoinhibition des CLIP par repliement intramoléculaire de la protéine (figures 26 et 29 D) (Lansbergen et al., 2004; Mimori-Kiyosue et al., 2005). Ce fragment joue ainsi le rôle de mutant dominant négatif (Neukirchen and Bradke, 2011a) et sa surexpression empêche la pénétration correcte des microtubules dans le cône de croissance, perturbe la formation de l'axone (figure 26) ainsi que la dynamique du cône de croissance. En contrepartie, la dépolymérisation de l'actine et l'inhibition de la myosine permettent de restaurer la formation de l'axone lors de l'inhibition des CLIP. Les auteurs ont suggéré que les protéines CLIP permettaient aux microtubules de pénétrer correctement dans le cône de croissance.

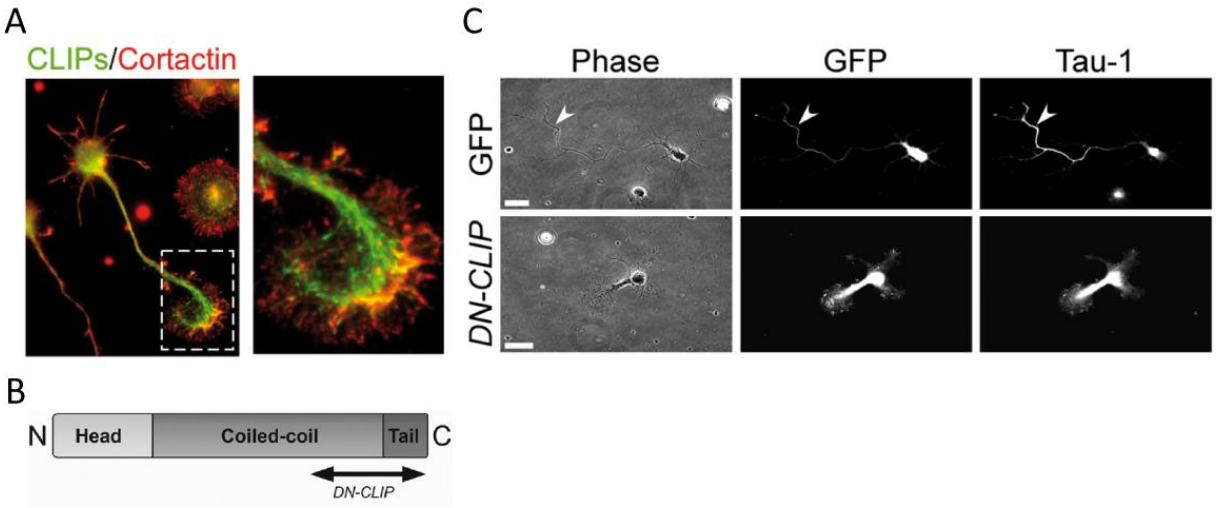


Figure 26 | L'inhibition des protéines CLIP perturbe la formation de l'axone.
A : Des neurones d'hippocampe de rat sont immunomarqués pour les protéines CLIP (vert) et la cortactine (rouge). Les protéines CLIP (sous forme de comètes) sont enrichies dans le cône de croissance et chevauchent les régions riches en actine. L'image de droite est un agrandissement du cône de croissance. **B :** Représentation schématique de CLIP-170 ainsi que du domaine capable d'interagir avec le domaine de liaison aux microtubules en amino-terminal des protéines CLIP et qui est impliqué dans l'auto-inhibition de la protéine (zone indiquée par la double flèche : DN-CLIP). **C :** La surexpression de DN-CLIP dans des neurones d'hippocampe de rat joue un rôle dominant négatif en interagissant avec le domaine de liaison aux microtubules des protéines endogènes et empêche la formation de l'axone. Barre d'échelle 20µm. Adapté de (Neukirchen and Bradke, 2011a).

La protéine **p150^{Glued}** est une sous-unité de la dynactine, elle-même associée au moteur moléculaire dynéine qui se déplace vers l'extrémité (-) des microtubules (structure figure 25). Le recrutement de p150^{Glued} à l'extrémité (+) des microtubules pourrait être effectué grâce à une interaction avec CLIP-170 via son domaine de liaison aux ions zinc (Goodson et al., 2003; Komarova et al., 2002; Valetti et al., 1999). En effet l'adressage de p150^{Glued} aux extrémités (+) est fortement perturbé lors de l'inhibition de CLIP-170 (Lansbergen et al., 2004). Cependant p150^{Glued} pourrait être également recrutée grâce à une interaction directe avec EB1 (figure 29D) (Askham et al., 2002; Ligon et al., 2003). p150^{Glued} est donc une protéine majeure dans le transport vésiculaire.

Les protéines CLASP

Les protéines CLASP (CLIP associated proteins) ont été identifiées à l'origine comme des partenaires des protéines CLIP (Akhmanova et al., 2001) et sont constituées de deux membres : les protéines CLASP1 (expression ubiquitaire) et CLASP2 (expression majoritairement neuronale). Les protéines CLASP possèdent des domaines TOG-like (tumor overexpressed gene) dans leur domaine amino-terminal qui peuvent se lier à la tubuline (Al-Bassam et al., 2006), et des motifs sérine-x-isoleucine-proline (SxIP) au niveau du domaine central reconnus par les protéines EB (figure 27) (Honnappa et al., 2009; Mimori-Kiyosue et al., 2005). Les protéines CLASP stabilisent les microtubules à la périphérie cellulaire en promouvant leurs pauses et en restreignant leurs périodes de croissance et de raccourcissement (Mimori-Kiyosue et al., 2005).

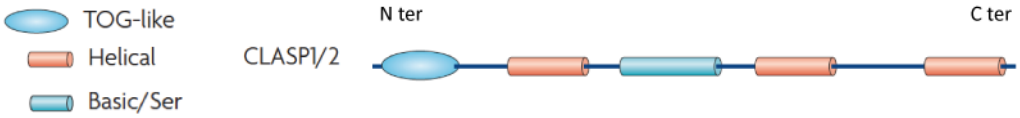


Figure 27 | Structure des protéines CLASP.
TOG-like : domaine de type TOG, Helical : structure en hélice, Basic/Ser : domaines basiques riches en sérines. Adapté de (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

Des travaux réalisés par Al-bassam et collaborateurs chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* sur l'homologue Clsp1 de CLASP suggèrent un mécanisme moléculaire pour expliquer le rôle stabilisateur des protéines CLASP. Ces auteurs ont pu montrer que la protéine était capable de lier un hétérodimère de tubulines α/β grâce à ses deux domaines TOG, et de se lier au microtubule via ses domaines riches en sérines et arginines (Al-Bassam et al., 2010). Les auteurs ont également effectué des expériences de polymérisation in vitro et ont pu montrer que Clsp1 promouvait le sauvetage des microtubules et supprimait les catastrophes. L'hypothèse formulée par Al-Bassam et collaborateurs est que la protéine Clsp1 jouerait un rôle de sauvetage en arrêtant les phénomènes de dépolymérisation grâce à son apport de dimères de tubuline, conduisant ainsi à un redémarrage de la polymérisation.

Chez la Drosophile, Orbit, la protéine orthologue des CLASP, est accumulée dans le cône de croissance des neurones. L'inactivation d'Orbit entraîne des défauts de motilité du cône de croissance et de croissance axonale (Lee et al., 2004). Les travaux de Lee et collaborateurs suggèrent que les protéines CLASP seraient impliquées dans les phénomènes de répulsion des cônes de croissance et inhiberaient la croissance axonale. De plus l'interaction de CLASP2 avec ses partenaires et les microtubules a été démontrée comme régulée par la phosphorylation par GSK-3β (Hur et al., 2011; Watanabe et al., 2009).

La protéine APC

La protéine APC (Adenomatous polyposis coli) tout comme les protéines CLASP possède un motif SxIP lui permettant d'interagir avec les protéines EB, conduisant à une stabilisation des microtubules (figures 28 et 29 D) (Wen et al., 2004). Cette stabilisation permettrait de favoriser la croissance axonale et serait dépendante de l'inactivation de la protéine GSK-3β (Zhou 2004 NGF-induced axon growth, Votin 2005).

De plus la protéine APC est accumulée dans le futur axone de neurones encore non polarisés ainsi que dans le cône de croissance axonal de neurones polarisés (Votin et al., 2005), suggérant que la protéine APC serait également requise au cours de la polarisation neuronale. Cette hypothèse est confirmée par des expériences de perturbation d'APC, soit par l'expression de mutants tronqués soit par transfection de shRNA, induisant des anomalies de structure des microtubules, de morphologie des cônes de croissance et de croissance axonale (Purro et al., 2008; Zhou et al., 2004). D'autres études réalisées sur des souris KO conditionnelles pour la protéine APC démontrent que APC est nécessaire à la polarisation des cellules de la glie radiaire corticale, sa délétion provoquant de graves défauts de formation des différentes couches corticales (Yokota et al., 2009). Néanmoins une délétion complète de la protéine chez la

Drosophile n'affecte en aucun cas la polarisation neuronale, les neurones n'exprimant pas APC étant toujours capables d'initier et d'étendre un axone (Rusan et al., 2008). L'importance d'APC au cours de la polarisation neuronale serait donc dépendante du modèle étudié.

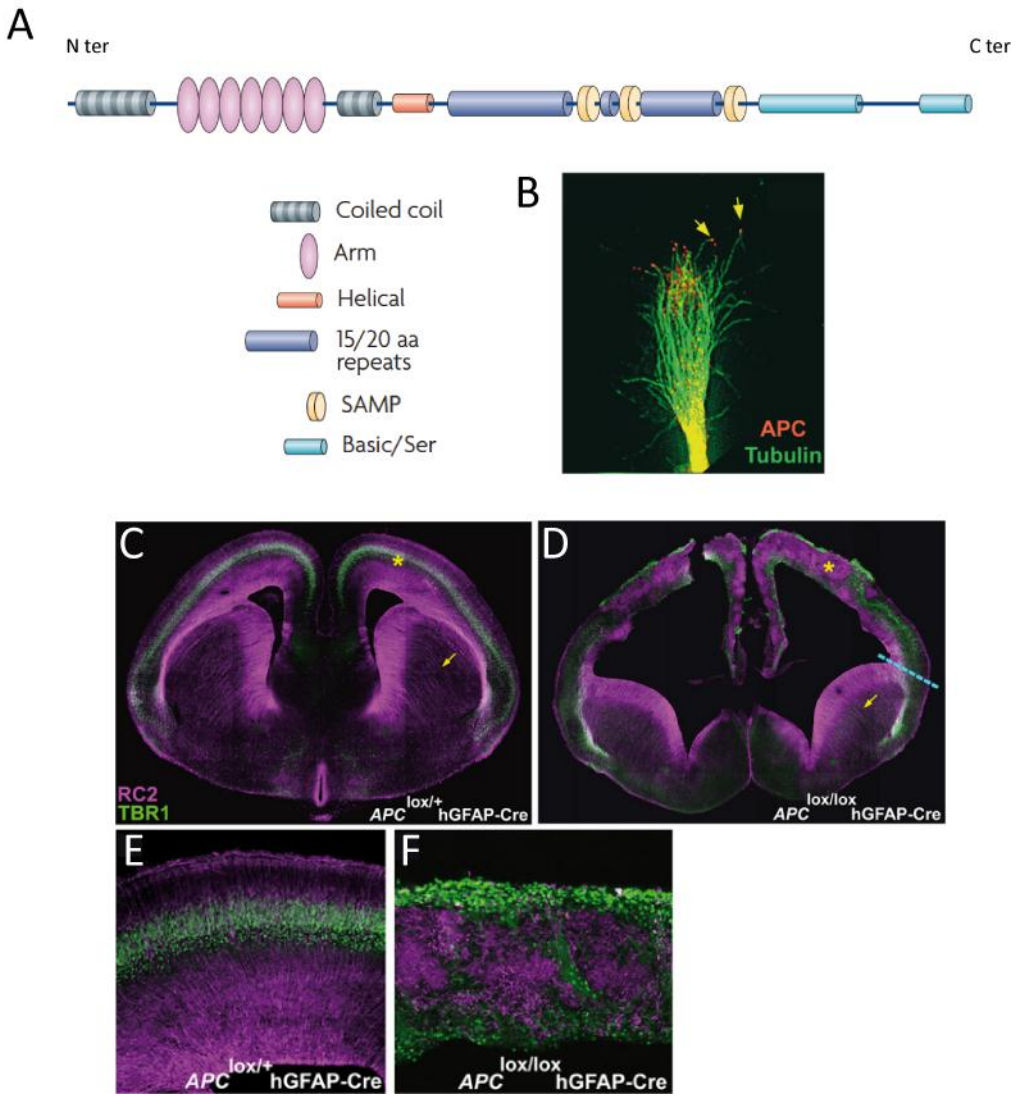


Figure 28 | Structure de la protéine APC et fonction dans le développement du cortex cérébral.
A : Structure de la protéine APC. Arm : répétitions Armadillo, Basic/Ser : domaines basiques riches en sérines, Coiled-coil : domaines coiled-coil, Helical : structure en hélice, SAMP : répétitions Ser-Ala-Met-Pro. **B :** Localisation de la protéine APC (rouge) à l'extrémité des microtubules (vert) dans le cône de croissance de neurones de ganglions de la racine dorsale de souris. **C à F :** L'inhibition de l'expression de la protéine APC spécifiquement dans la glie radiaire corticale (D et F) perturbe le développement de cette glie radiaire (révélée en violet). En effet dans des souris contrôle à E16 (C et E) le cortex possède un échafaudage de glie radiaire (astérisque jaune, C) et une lamination corticale (E) normaux (TBR1 en vert marque les neurones différenciés dans les couches supérieures du cortex). Adapté de (Akhmanova and Steinmetz, 2008 ; Yokota et al., 2009 ; Zhou et al., 2004).

Les protéines EB

La famille des protéines EB comporte trois membres : EB1, 2 et 3. La protéine EB1 a été identifiée dans un premier temps comme partenaire de la protéine APC (Su et al., 1995) et comme EB2 elle est exprimée de façon ubiquitaire, tandis que EB3 est essentiellement exprimée dans le système nerveux et musculaire (Nakagawa et al., 2000). Les protéines EB possèdent un **domaine amino-terminal** très conservé avec une structure globulaire similaire au domaine d'homologie de la calponine (CH domain pour calponin homology domain), domaine retrouvé dans des protéines s'associant à l'actine (Gimona et al., 2002). Cette partie amino-terminale de la protéine lui permet d'interagir avec les microtubules (Komarova et al., 2009). Les protéines EB peuvent se dimériser de façon parallèle grâce à leur **domaine « coiled-coil » central** (Slep et al., 2005). La **partie carboxy-terminale** contient le domaine d'homologie EB ainsi que le motif EEY/F à l'extrémité, motif nécessaire pour recruter d'autres protéines +TIP à l'extrémité (+) des microtubules (figure 29 A) (Komarova et al., 2005).

Les protéines EB sont considérées comme des pivots de la régulation de la dynamique des microtubules, elles jouent un rôle central dans le recrutement de plusieurs protéines +TIP (figure 29 D). Les protéines EB possèdent des propriétés de régulation de la dynamique des microtubules qui sont différentes selon les conditions expérimentales. Par exemple *in vivo* elles stimulent la dynamique et la croissance des microtubules (figure 29 B et C) tout en supprimant les phénomènes de catastrophe (Komarova et al., 2009). Cependant les travaux réalisés par Vitre et collaborateurs ont mis en évidence un phénomène plus contrasté. Leurs expériences de polymérisation *in vitro* analysées par cryomicroscopie électronique suggèrent que EB1 favoriserait la fermeture des feuillets de microtubules, pouvant augmenter leur rigidité. EB1 promouvrait les catastrophes de polymères devenus trop rigides, mais à partir d'une certaine concentration la protéine EB1 permettrait le sauvetage des microtubules (Vitre et al., 2008). Les rôles et les modes d'action de la protéine EB1 sont donc toujours ouverts au débat.

Les protéines EB représentent également un outil de mesure des paramètres de la dynamique des microtubules et offrent une alternative à l'utilisation de constructions exprimant de la tubuline fusionnée à la GFP ou à l'injection de tubuline couplée à un fluorochrome. En effet, Stepanova et collaborateurs ont montré qu'il était possible de visualiser protéines EB3-GFP accumulées sous forme de comètes pour suivre et analyser la dynamique des bouts + des microtubules (Stepanova et al., 2003).

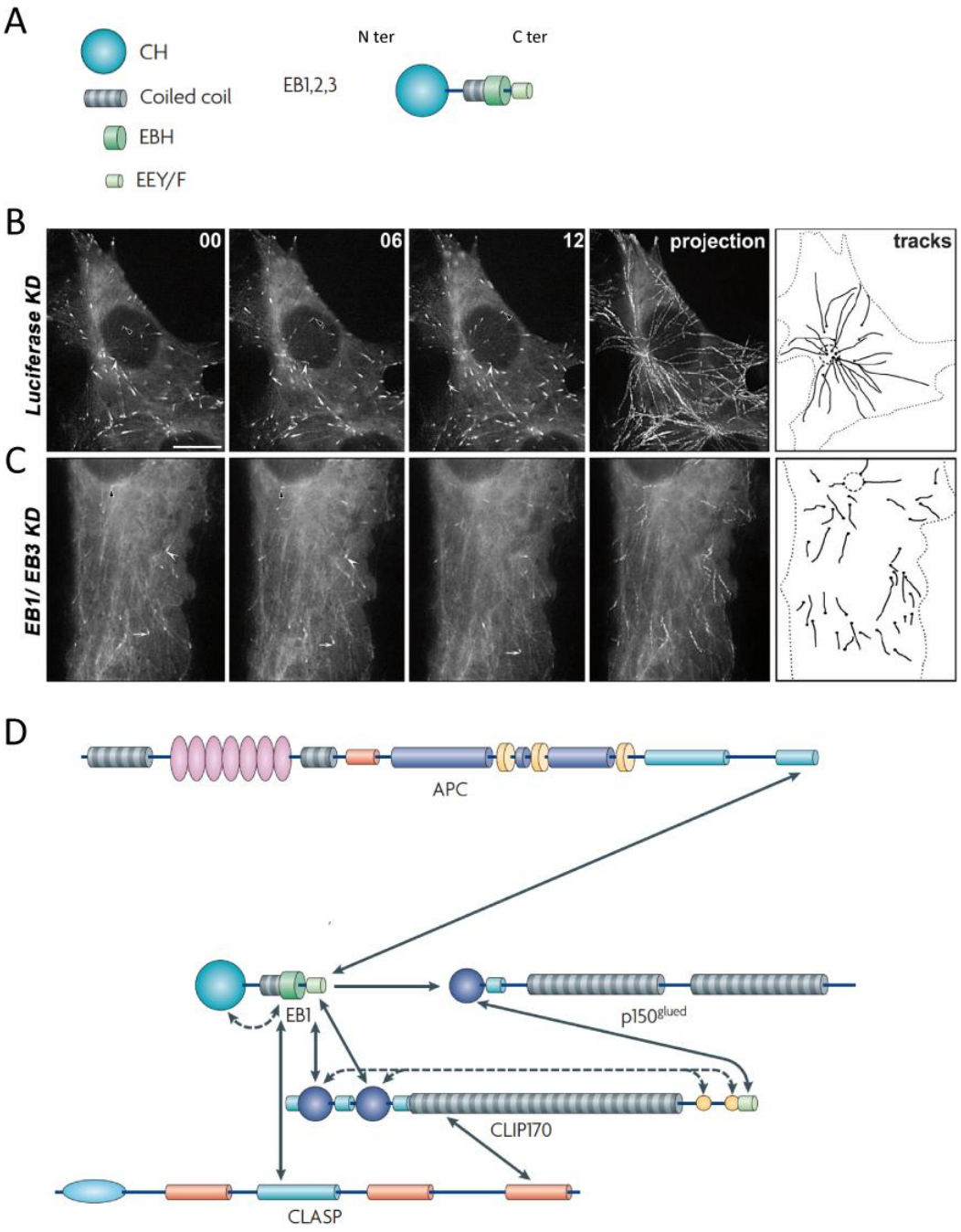


Figure 29 | Structure et fonction des protéines EB.
A : Structure des protéines EB. CH : calponin homology, Coiled-coil : domaines coiled-coil, EBH : End binding homology, EEY/F : motif EEY/F. **B et C :** L'inhibition des protéines EB1 et EB3 perturbe la persistance de croissance des microtubules. Des cellules exprimant stablement CLIP-170 (tag YFP, cellules CHO-K1) ont été transfectées par des shRNA (short hairpin ARN) ciblant la luciférase (contrôle, B) ou les protéines EB1 et EB3 (EB1/EB3 KD, C) puis des images ont été acquises par vidéomicroscopie (le temps est indiqué en haut à droite en secondes). Une analyse de la projection de séquences (20 images successives, « projection ») et de diagrammes de la trajectoire de comètes de CLIP-170 (« tracks ») révèle que l'inhibition de l'expression de EB1 et EB3 diminue le temps de persistance des microtubules. **D :** Schéma représentant les différentes interactions possibles entre les protéines des bouts plus des microtubules (les domaines de liaison des protéines sont ciblés par les doubles flèches). Les interactions intramoléculaires sont en pointillés. Adapté de (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Komarova et al., 2009).

Au cours de ce chapitre, nous avons pu aborder les mécanismes de polymérisation/dépolymérisation des microtubules et les différents facteurs régulant leur dynamique, tels que les modifications post-traductionnelles des tubulines ou encore les protéines s'associant aux microtubules. La régulation de l'instabilité dynamique est très importante pour que les microtubules puissent accomplir leurs fonctions. Nous allons maintenant voir que les microtubules peuvent être liés fonctionnellement aux cadhérines et que chacun d'entre eux peut agir sur la fonction de l'autre.

Chapitre III: Relations cadhérines – microtubules

Les relations cadhérines - microtubules ont été relativement peu étudiées, bien que de plus en plus de preuves expérimentales mettent en évidence un lien fonctionnel entre les deux. Nous décrirons au cours de ce chapitre quelles sont les données connues à ce jour sur la nature de la relation entre les cadhérines et les microtubules, quel est l'impact sur ces deux partenaires. Nous aborderons également comment les Rho GTPases et l'actine pourraient intervenir et réguler les relations entre les cadhérines et les microtubules.

1. Impacts des contacts cadhérines-dépendants sur l'organisation et la dynamique des microtubules

1.1. Régulation de la dynamique des microtubules

Comme décrit précédemment (voir Chapitre II 1. paragraphe d'introduction), certains microtubules peuvent être non centrosomaux. Afin de comprendre comment ces microtubules pouvaient être stabilisés, Chausovsky et collaborateurs ont réalisé des expériences à partir de cytoplastes de fibroblastes (cellules CHO) sans centrosomes (Karsenti et al., 1984). En absence de centrosome, quelques microtubules persistent sous la forme d'un réseau peu dense et éparpillé à l'intérieur de la cellule (Chausovsky et al., 2000). L'expression de la E- et de la N-cadhérine augmente la densité de ces microtubules, provoquant également une modification de leur dynamique des microtubules lorsque les cellules sont en contact. Les microtubules passent d'un comportement de « tapis roulant » (raccourcissement de l'extrémité (-) et élongation de l'extrémité (+)) à un état d'instabilité dynamique. Des travaux antérieurs avaient montré que c'était la stabilisation de l'extrémité (-) qui conférerait cette instabilité dynamique des microtubules (Rodionov et al., 1999). Chausovsky et collaborateurs ont en donc déduit que les contacts cadhérine dépendants permettraient la stabilisation des extrémités (-) des microtubules favorisant la formation d'un réseau stable de microtubules.

Waterman-Storer et collaborateurs ont pu mesurer les paramètres dynamiques des microtubules dans des cellules épithéliales de poumons de triton en contact ou en migration. Ils ont pu démontrer que contrairement aux cellules en migration possédant des microtubules avec une grande instabilité dynamique, les contacts intercellulaires induisaient une quiescence des extrémités (+) des microtubules qui ne subissaient pas de flux rétrograde du contact vers le centre de la cellule (Waterman-Storer et al., 2000).

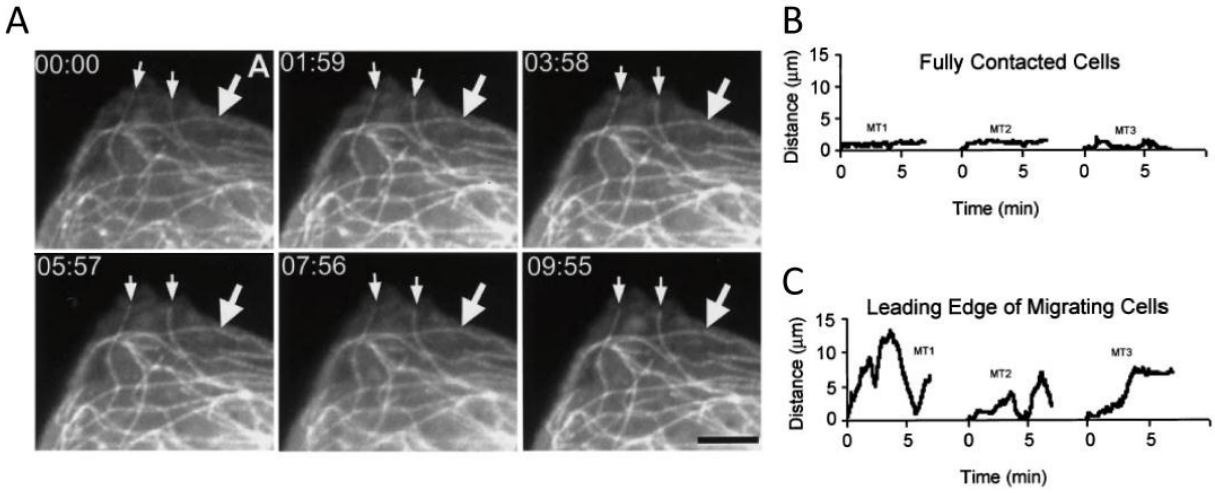


Figure 30 | **Les contacts dépendants des cadhérines stabilisent les extrémités (+) des microtubules.** **A :** Acquisition séquentielle en vidéomicroscopie d'une cellule épithéliale micro-injectée avec de la tubuline marquée à la rhodamine et qui est en contact de chaque côté avec d'autres cellules (non visibles car non injectées avec de la tubuline). Les microtubules sont soit dirigés vers le contact (petites flèches), soit parallèles au contact (grosse flèche). Barre d'échelle 5µm, temps en minutes. **B et C :** Comparaison du profile de la vitesse de déplacement des microtubules au niveau du bord de la cellule dans des cellules en contact (B) ou pas (C). Lorsque les cellules sont en contact (B) les microtubules sont quiescents et très souvent en pause par rapport à des microtubules dans des cellules en migration qui sont très mobiles (C). Représentation du profile de 3 microtubules par condition (MT1 à 3). Tiré de (Waterman-Storer et al., 2000).

Shtutman et collaborateurs ont testé l'impact de l'adressage à la membrane de différentes caténines sur la stabilisation du réseau de microtubules dans des cytoplastes sans centrosomes de cellules CHO. Pour cela ils ont induit l'expression de protéines chimères de caténines fusionnées aux domaines extracellulaire et transmembranaire des récepteurs de l'interleukine 2 (LaFlamme et al., 1992; Shtutman et al., 2008). L'ancrage à la membrane plasmique des caténines p120 et β n'a aucun effet sur les microtubules tandis que l'adressage de l'α-caténine à la membrane plasmique permet d'augmenter la longueur des microtubules et leur densité de la même manière que l'expression de cadhérines (Chausovsky et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les contacts dépendants de la cadhérine seraient capables d'induire le recrutement des microtubules dans les zones de contact intercellulaire et de les stabiliser par l'intermédiaire de l'alpha-caténine.

1.2. Recrutement des microtubules au niveau des contacts intercellulaires

L'une des pistes suggérant une relation fonctionnelle entre les microtubules et les récepteurs d'adhésion est fondée sur l'observation de l'organisation des microtubules au niveau des contacts. En effet les microtubules peuvent être localisés dans une zone très proche des jonctions intercellulaires de façon relativement perpendiculaire. Les microtubules peuvent également se projeter dans les zones de contacts naissants établis par des cellules épithéliales (Ligon et al., 2001; Stehbens et al., 2006) (figure 31).

Dans des cellules épithéliales le désassemblage des jonctions intercellulaires au cours d'expériences de « switch calcium », consistant à supprimer le calcium puis à le rajouter afin de simuler un désassemblage et une formation de contacts, induit un changement de la directionnalité des microtubules. En effet les microtubules deviennent courbés lors de la rupture des jonctions, se « détournant » du contact cellule-cellule (Ligon et al., 2001; Stehbens et al., 2006). Cependant cet état est réversible après l'addition de calcium (Ligon et al., 2001; Stehbens et al., 2006). Ces expériences suggèrent donc que les contacts intercellulaires permettent le recrutement des microtubules (figure 31).

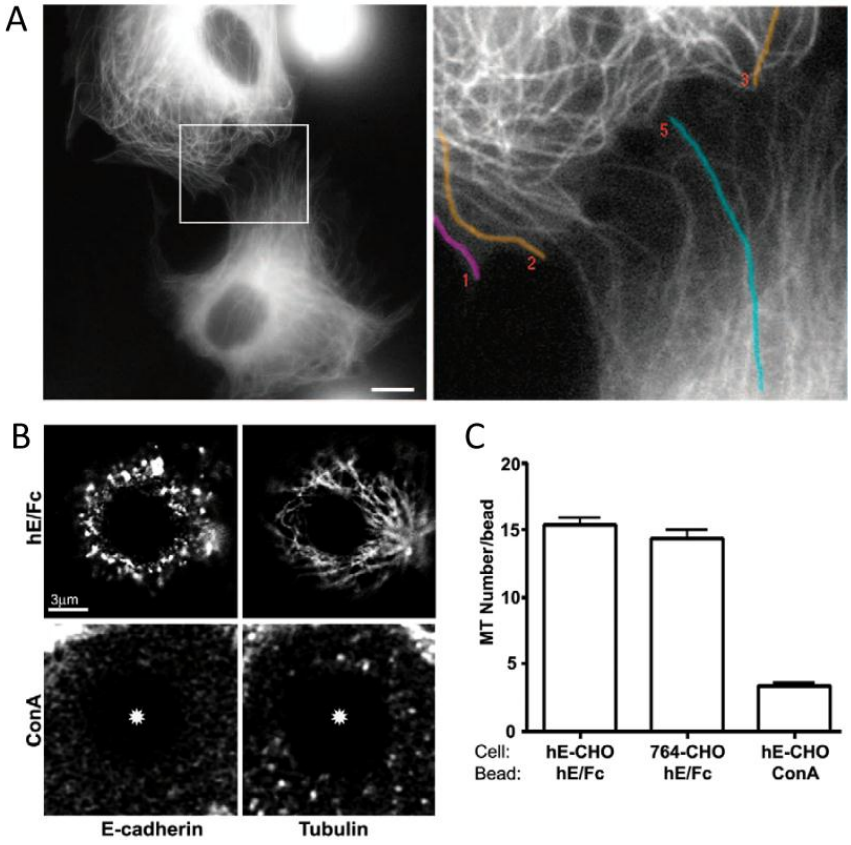


Figure 31 | Les contacts dépendants des cadhérines recrutent les microtubules dans les cellules épithéliales.

A : Des cellules épithéliales (Ptk2) exprimant de la tubuline-GFP ont été traitées avec des chélateurs d'ions calcium pour désassembler les contacts intercellulaires puis filmées lors de l'ajout de milieu contenant du calcium. L'image de gauche représente une image de l'acquisition au cours de la reformation des contacts. Barre d'échelle 10µm. L'image de droite représente un grossissement de la zone encadrée sur l'image de gauche avec des microtubules (1-3 et 5) en pseudo-couleurs et montre que les microtubules ciblent les contacts lors de leur formation. **B et C :** Afin de créer des contacts uniquement dépendants de la E-cadhérine, des billes recouvertes de E-cadhérine recombinante (hE/Fc) ou de concanavaline A (ConA, contrôle) ont été déposées sur des cellules CHO exprimant stablement la E-cadhérine humaine (hE-CHO) ou la E-cadhérine sans son domaine de liaison à la caténine p120 (764-CHO). Lors du dépôt de billes recouvertes de E-cadhérine, on observe une accumulation de E-cadhérine et un recrutement des microtubules dans les zones d'adhésion (B), résultat confirmé par la quantification du nombre de microtubules ciblant les contacts (C). De plus la liaison de la caténine p120 ne serait pas impliquée dans le recrutement des microtubules aux contacts. Adapté de (Ligon and Holzbaur, 2007; Stehbens et al., 2006).

Néanmoins les adhésions intercellulaires sont dépendantes de diverses molécules adhésives (voir Chapitre I paragraphe 1), c'est pourquoi Stehbens et collaborateurs ont cherché à établir des contacts engageant uniquement la E-cadhérine, grâce à l'utilisation de billes E-cadhérine-Fc (Drees et al., 2005b) déposées sur des cellules CHO (Stehbens et al., 2006). Les cellules CHO, transfectées par de la E-cadhérine montrent un recrutement des microtubules aux zones de contacts billes-cellules (figure 31 B et C). Ces résultats démontrent que la E-cadhérine est capable d'induire un recrutement des microtubules au niveau des contacts dépendants des cadhérines.

2. Capture de l'extrémité des microtubules

Les données sur l'influence des contacts dépendants des cadhérines sur la dynamique et le recrutement des microtubules ont donc mené les chercheurs à rechercher par quels mécanismes moléculaires les complexes d'adhésion pouvaient réguler les microtubules.

2.1. Capture des extrémités (+) des microtubules

Les microtubules ancrés au centrosome peuvent orienter leur extrémité (+) vers les contacts cellulaires dépendants des cadhérines, laissant supposer une interaction cadhérines-microtubules. Dans les cellules épithéliales, les microtubules avec la protéine **CLIP-170** accumulée sous la forme de comète à leur extrémité, sont dirigés vers les contacts intercellulaires (Stehbens et al., 2006). L'expression d'un mutant dominant négatif de CLIP-170 perturbe la dynamique des microtubules qui n'atteignent plus les contacts et diminue la quantité de E-cadhérine ainsi que son turnover aux contacts cellulaires. Ces résultats suggèrent que l'adressage de CLIP-170 aux contacts permet la concentration de cadhérine au niveau des zones d'adhésion. L'interaction de CLIP-170 avec les complexes cadhérine/caténines pourrait être effectuée par la protéine **IQGAP1**, capable d'interagir d'une part avec la β-caténine (Kuroda et al., 1998) et d'autre part avec CLIP-170 (Fukata et al., 2002a). **APC** est une autre protéine des extrémités (+) des microtubules qui elle aussi peut interagir avec IQGAP1 de manière dépendante des RhoGTPases Rac1 et Cdc42, et pourrait permettre le recrutement des microtubules associés à CLIP-170 (Watanabe et al., 2004). APC interviendrait également dans le recrutement de microtubules aux zones d'adhésion dépendantes des cadhérines grâce à son association avec **EB1** et **mDia**, suite à l'activation de RhoA comme décrit dans le Chapitre III paragraphe 3.1. (Wen et al., 2004).

Le recrutement des extrémités (+) des microtubules par les cadhérines pourrait être également réalisé grâce à l'association de moteurs moléculaires tels que la **dynéine**. La dynéine, qui co-localise avec la β-caténine au niveau des contacts intercellulaires et avec laquelle elle immunoprécipite, serait un point d'ancrage des microtubules aux contacts de manière transitoire (Ligon et al., 2001). La localisation de la dynéine est perturbée suite à la dépolymérisation de l'actine (Ligon et al., 2001) et sa délocalisation consécutive à l'injection

d'anticorps anti-dynéine engendre une diminution de la liaison des microtubules et de l'accumulation de la caténine p120 aux contacts (Ligon and Holzbaur, 2007). Ces résultats suggèrent un ancrage des microtubules par leur extrémité (+) aux contacts dépendants des cadhérines. De plus cette capture pourrait être effectuée grâce à une interaction dynéine/β-caténine.

Les travaux de Ligon et collaborateurs montrent que cet ancrage ne nécessiterait pas la présence de la dynactine. En effet $p150^{Glued}$, une protéine +TIP appartenant au complexe dynactine (voir Chapitre II paragraphe 2.2.4.e), n'est pas présente aux contacts. De manière additionnelle le désassemblage du complexe dynactine ne perturbe pas la formation des contacts (Ligon and Holzbaur, 2007). Ces résultats sont en partie en désaccord avec le modèle d'ancrage des microtubules proposé par Shaw et collaborateurs, (Shaw et al., 2007). Ces auteurs ont pu mettre en évidence grâce à des substrats Ncad-Fc que les contacts N-cadhérine recrutaient les microtubules décorés par des comètes EB1 et que cela permettait l'accumulation des connexines 43 aux contacts intercellulaires. Ils ont montré que l'inhibition de l'expression d'EB1, de la β-caténine ou encore de $p150^{Glued}$ empêchait la formation des jonctions gap. Ils ont donc formulé l'hypothèse que les sous-unités de connexine 43 seraient adressées aux contacts intercellulaires grâce à un ancrage des microtubules aux cadhérines, via une interaction de $p150^{Glued}$ avec la β-caténine.

Cette liaison des microtubules aux cadhérines pourrait être modulée par l'état de N-glycosylation du domaine extracellulaire des cadhérines qui modifie leur interaction (voir Chapitre I paragraphe 2.3.2 (Guo et al., 2009)). En effet Jamal et collaborateurs ont utilisé un variant hypoglycosylé de la E-cadhérine, permettant une meilleure interaction des domaines extracellulaires et ont pu constater qu'une faible glycosylation de la E-cadhérine permettait une meilleure interaction β-caténine/dynéine (Jamal et al., 2009).

Les protéines de la famille des +TIP représentent donc des candidates très intéressantes pour réguler l'adressage des microtubules par leur extrémité (+) aux contacts intercellulaires dépendants des cadhérines (figure 32). Cependant en raison du grand nombre de protéines +TIP et du réseau complexe d'interactions qu'elles peuvent former à l'extrémité des microtubules, il est nécessaire de porter une attention particulière à l'environnement cellulaire et aux conditions d'expérience utilisées. En effet selon le type cellulaire et le type de contact sont des paramètres qui vont influencer de manière certaine l'identité des protéines impliquées.

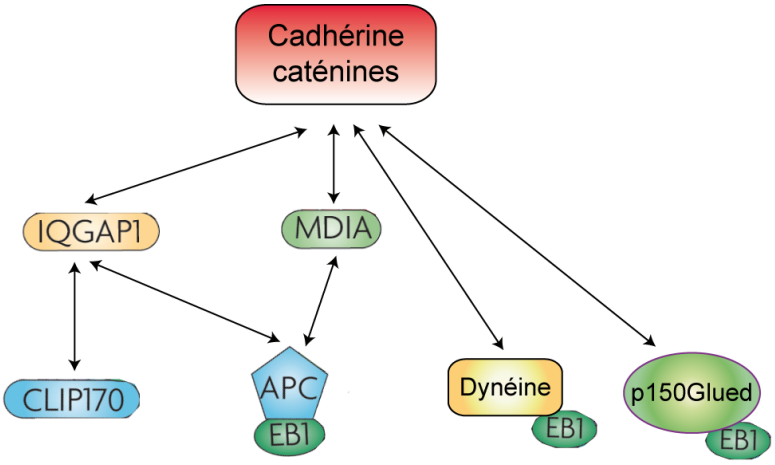


Figure 32 | Représentation graphique des différents modèles moléculaires de capture de l'extrémité des bouts (+) des microtubules par les cadhérines.
Les complexes cadhérine/caténines pourraient interagir directement avec les microtubules grâce à une interaction entre la β-caténine et la dynéine ou $p150^{Glued}$, ces deux protéines étant localisées à l'extrémité (+) des microtubules grâce à une association avec EB1. Le recrutement des microtubules aux complexes cadhérine/caténines pourrait être également effectué de manière indirecte via des protéines associées à l'actine. En effet CLIP-170 et APC sont capables d'interagir avec IQGAP1, une protéine pouvant interagir avec la β-caténine. Par ailleurs APC peut être localisée dans un même complexe que EB1 et mDia, une protéine régulée par la RhoGTPAse RhoA. Attention les voies passant par IQGAP1 et mDia ne sont que des hypothèses, les interactions cadhérines/IQGAP1 ou mDia/protéines des bouts (+) n'ayant pas été démontrées.

2.2. Capture des extrémités (-) des microtubules

Les microtubules sont généralement organisés sous forme d'un réseau radial ancré au centrosome. Cependant certains types cellulaires possèdent de manière additionnelle des microtubules non attachés au centrosome (voir introduction du paragraphe 1 du chapitre II).

Dans le cas des cellules épithéliales le sous-ensemble de microtubules parallèles à la membrane apico-latérale présente des extrémités (-) des microtubules au niveau apical des cellules (Bacallao et al., 1989), région contenant les jonctions adhérentes. Afin d'explorer la relation fonctionnelle entre les jonctions adhérentes et les microtubules, Meng et collaborateurs ont cherché à comprendre comment ces microtubules pouvaient adresser leur extrémité (-) au niveau des contacts dépendants des cadhérines (Meng et al., 2008). Pour cela ils ont choisi d'étudier la piste de la caténine p120 qui est capable de s'associer aux microtubules (Chen et al., 2003; Yanagisawa et al., 2004). Ils ont montré que p120 possédait comme partenaire d'interaction la protéine PLEKHA7 (pleckstrin homology domain-containing, family A member 7). PLEKHA7 co-immunoprécipite avec la caténine p120 ainsi qu'avec la E-cadhérine, de plus le siRNA et la surexpression de PLEKHA7 entraînent respectivement une diminution et une augmentation de la quantité de E-cadhérine accumulée aux contacts. Ces résultats suggèrent que PLEKHA7 joue un rôle dans la stabilisation de la E-cadhérine aux contacts intercellulaires. Meng et collaborateurs ont identifié comme partenaire de PLEKHA7 une protéine homologue de la

patronine (voir ch.II paragraphe 2.2.4.d (Goshima et al., 2007)) qu'ils ont baptisée Nezha. Ils ont caractérisé Nezha comme étant une protéine des extrémités (-) des microtubules non centrosomaux dont l'inhibition de l'expression diminue, tout comme PLEKHA7, la quantité de E-cadhérine accumulée aux contacts. Les auteurs proposent que l'adressage de l'extrémité (-) des microtubules soit réalisé grâce à l'interaction du complexe Nezha/PLEKHA7 avec la caténine p120, permettant ainsi le transport du moteur moléculaire KIFC3 qui régulerait la concentration de E-cadhérine aux contacts (figure 33 A).

Dans leurs travaux Meng et collaborateurs montrent que Nezha ne colocalise ni avec le centrosome ni avec la ninéine, la ninéine étant une protéine décrite comme relarguée du centrosome et redistribuée au cortex apical des cellules épithéliales (voir paragraphe 2.2.4.d. du Ch.II). Bellett et collaborateurs proposent un mécanisme différent de recrutement des microtubules non centrosomaux le long des membranes apico-latérales, qui nécessiterait la localisation de cette ninéine aux jonctions adhérentes (Bellett et al., 2009). En effet ces auteurs ont pu observer dans les cellules épithéliales MDCK que la nucléation des microtubules avait lieu à partir du centrosome, formant un réseau radial de microtubules. Ensuite ce réseau radial diminue et en parallèle un réseau apico-latéral de microtubules apparait. Les auteurs se sont alors demandé comment les microtubules apico-latéraux étaient adressés dans cette région. Ils ont formulé l'hypothèse que les microtubules s'ancraient via leur extrémité (+) aux jonctions adhérentes par une liaison dépendant de la dynéine. Suite au transport de la ninéine du centrosome aux jonctions adhérentes le long des microtubules, les microtubules seraient ensuite transloqués le long de la membrane apico-latérale grâce à une tension générée par la dynéine. Ce mécanisme aboutirait à des microtubules possédant leur extrémité (-) au niveau apical et stabilisés par la ninéine (figure 33 B).

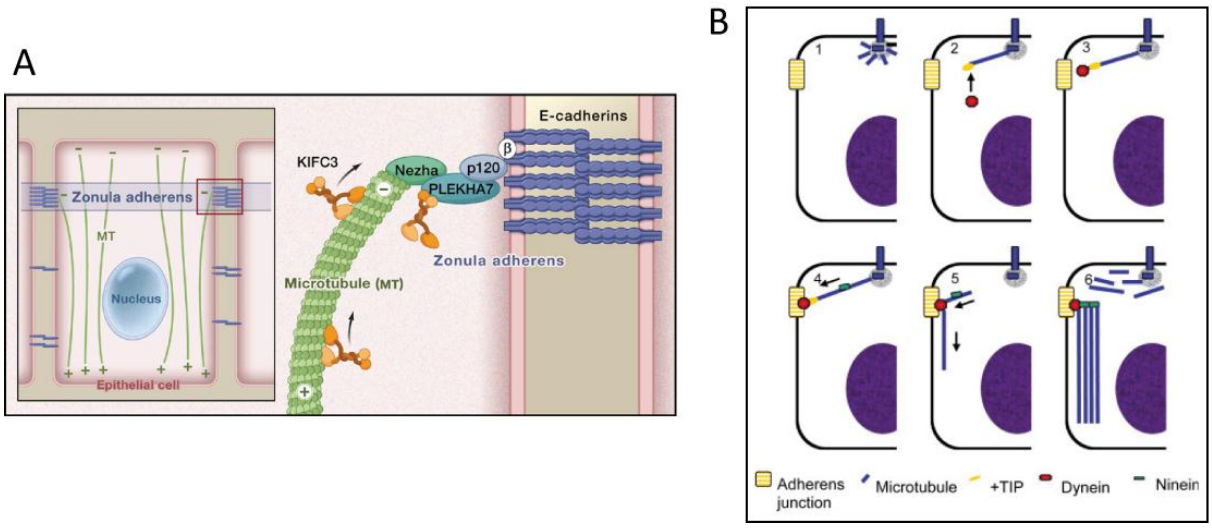


Figure 33 | Modèles moléculaires de capture de l'extrémité des bouts (-) de microtubules non centrosomaux dans les cellules épithéliales.

A : Modèle proposé par Meng et collaborateurs, où l'extrémité (-) des microtubules est capturée grâce à une interaction de la protéine des bouts (-) Nezha avec PLEKHA7, qui interagit avec la caténine p120. Ces interactions favoriseraient la concentration des cadhérines, notamment grâce à l'aide de KIF3C (moteur moléculaire se dirigeant vers l'extrémité (-) des microtubules).

B : Modèle proposé par Bellett et collaborateurs où l'adressage des microtubules aux jonctions adhérentes serait réalisé par capture des extrémités (+) et (-). Dans un premier temps les microtubules ancrés au centrosome cibleraient les jonctions adhérentes via leur extrémité (+) (1) et interagiraient avec les jonctions adhérentes grâce au recrutement de la dynéine (2 et 3), formant ainsi un réseau radial de microtubules. Dans un deuxième temps la ninéine transloquerait du centrosome aux jonctions adhérentes le long des microtubules (4). Ensuite le moteur dynéine générerait une tension permettant de relarguer les microtubules du centrosome et de les transloquer vers les jonctions adhérentes (5). Enfin l'extrémité (-) des microtubules serait capturée et stabilisée aux jonctions adhérentes grâce à la ninéine, tandis que l'extrémité (+) continuerait de s'allonger le long des membranes apico-latérales vers le pôle basal des cellules (6). Tiré de (Akhmanova and Yap, 2008; Bellett et al., 2009).

Ces résultats mettent en évidence un ancrage des microtubules par leur extrémité (-) au niveau des contacts dépendants des cadhérines dans les cellules de type épithélial. Cependant ce domaine de recherche devra être exploré plus largement afin de déterminer plus clairement le mécanisme d'adressage des microtubules à ce type de jonctions.

3. Impact des microtubules sur la formation et la stabilité des contacts

La stabilisation des cadhérines au niveau des contacts, comme nous l'avons décrit précédemment dans le chapitre I est dépendante de leur ancrage au cytosquelette d'actine. Cependant, nous allons voir que le réseau de microtubules peut lui aussi en retour avoir un ascendant sur les contacts dépendants des cadhérines.

3.1. Les microtubules régulent de façon positive les cadhérines aux contacts intercellulaires

Afin de tester l'impact des microtubules sur les contacts cellulaires, une approche couramment utilisée est de les perturber avec des drogues induisant leur dépolymérisation (nocodazole, colchicine…) ou leur stabilisation (taxol, docitaxel, pacitaxel). Lors de traitements de cellules épithéliales avec de la colchicine, Yap et collaborateurs ont pu quantifier par des mesures électrophysiologiques que la destructuration des microtubules entraîne une forte diminution de la résistance trans-épithéliale (Yap et al., 1995a), traduisant une baisse de la perméabilité jonctionnelle. De plus ces traitements induisent une perturbation de la localisation de ZO-1 le long des contacts ainsi que de la E-cadhérine. Ces résultats suggèrent donc que les microtubules seraient importants dans le maintien des contacts. Par ailleurs les microtubules sont également nécessaires à la localisation des cadhérines à la membrane plasmique au cours de la myogenèse. La localisation des cadhérines à la membrane plasmique des myoblastes est une étape requise pour leur fusion (Charrasse et al., 2002)(Kaufmann et al., 1999; Zhang et al., 2009).

Comment les microtubules pourraient-ils influer sur la localisation des cadhérines aux contacts ? Stehbens et collaborateurs ont constaté que la dépolymérisation des microtubules ne modifiait pas la quantité de E-cadhérine à la surface des cellules (Stehbens et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'accumulation des cadhérines aux contacts intercellulaires ne serait pas régulée par son trafic à la membrane. Cependant des travaux ultérieurs ont montré que l'intégrité et la dynamique des microtubules étaient importantes dans la formation et le maintien des contacts (Ligon and Holzbaur, 2007; Stehbens et al., 2006; Waterman-Storer et al., 2000) (figure 34). Certains auteurs ne sont pas entièrement d'accord sur les conséquences de la dépolymérisation des microtubules. En effet Kaufmann et collaborateurs montrent par des expériences de co-immunoprécipitation de la M-cadhérine que les caténines α et β ne sont pas dissociées de la cadhérine après traitement des myoblastes au nocodazole (Kaufmann et al., 1999). A l'inverse, Waterman-Storer et collaborateurs observent une perte de la localisation des caténines aux contacts après avoir traité leurs cellules épithéliales avec la même drogue (Waterman-Storer et al., 2000). Ces auteurs montrent que la perturbation des microtubules entraîne également une modification de l'actine dont l'accumulation aux contacts est diminuée (Waterman-Storer et al., 2000) ou réorganisée sous la forme d'anneaux contractiles (Ivanov et al., 2006).

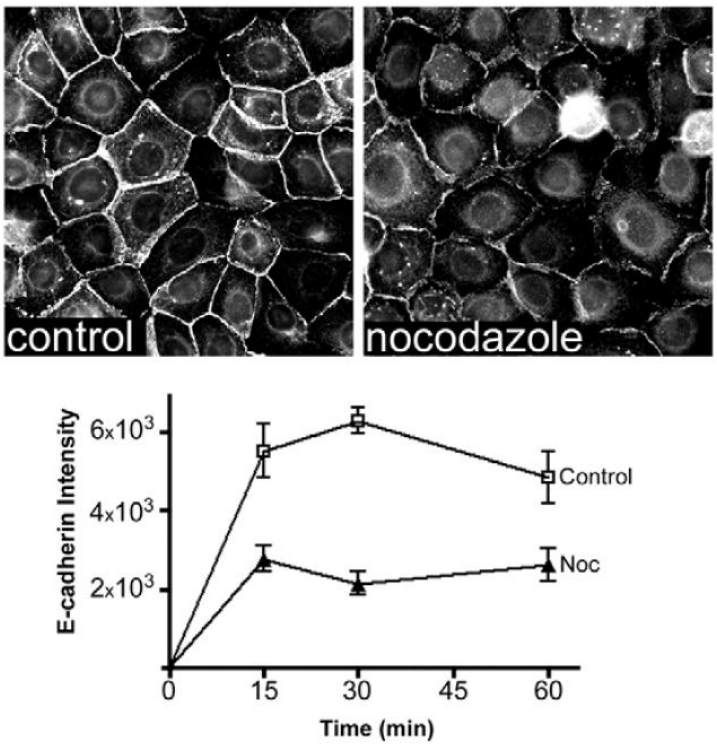


Figure 34 | L'intégrité des microtubules est nécessaire à l'accumulation des cadhérines lors de la formation des contacts dans les cellules MCF-7.
Des cellules épithéliales MCF-7 cultivées à confluence ont été incubées avec un chélateur des ions calcium afin de rompre les contacts (0 minutes), puis le calcium a été rajouté en présence de DMSO (« control ») ou de nocodazole. Des échantillons ont été fixés à différents temps et marqués pour la E-cadhérine (images en haut : fixation à 30 minutes). Le graphe représente la mesure de l'intensité de fluorescence de E-cadhérine aux contacts selon les traitements. Tiré de (Stehbens et al., 2006).

Cette formation d'anneaux contractiles d'actine pourrait être expliquée par l'implication de la myosine II. Des travaux de Shewan et collaborateurs montrent que la myosine II est recrutée et activée aux contacts dépendants des cadhérines en réponse à une signalisation dépendante de la kinase Rho. Ce phénomène est nécessaire à l'accumulation de la E-cadhérine aux contacts (Shewan et al., 2005). Cependant lorsque les microtubules sont dépolymérisés, la quantité de myosine II aux contacts est diminuée ainsi que les niveaux de myosine II activée dans des cellules étalées sur substrat Ecad-Fc (Stehbens et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les cadhérines pourraient recruter les microtubules aux contacts cellulaires. Ces microtubules pourraient induire la stimulation de la myosine II, qui en retour favoriserait l'accumulation des cadhérines aux contacts intercellulaires.

3.2. Les microtubules régulent de façon négative les cadhérines aux contacts intercellulaires

L'impact des microtubules sur les contacts intercellulaires dépendants des cadhérines décrit dans le paragraphe précédent indique que les microtubules agiraient en faveur de la formation et de la stabilisation des contacts. Cependant cela ne semble pas vrai pour tous les types cellulaires. Bien que ce phénomène soit beaucoup moins décrit dans la littérature il est établi que les microtubules peuvent également défavoriser la formation des contacts dépendants des cadhérines.

Dans le cas de kératinocytes non différenciés (cellules NHEK pour Normal human epithelial kidney) la déstructuration des microtubules entraîne une accumulation de la E-cadhérine, des caténines α et β et de la vinculine au niveau des contacts intercellulaires (Kee and Steinert, 2001). Cette accumulation des complexes cadhérine/caténines est inhibée une fois que

les cellules ont débuté leur différenciation. De manière relativement similaire des travaux effectués avec des cellules épithéliales bronchiques (H292) démontrent que des traitements avec du nocodazole entraînent l'accumulation de la β-caténine et de l'actine aux contacts cellulaires (Lorenowicz et al., 2007). Ces traitements résultent également en une augmentation de la résistance trans-épithéliale, ces résultats étant en complète opposition avec ceux décrits par Yap et collaborateurs (Yap et al., 1995a). Ceci met bien en évidence que les régulations cadhérines-microtubules sont dépendantes du type cellulaire et des conditions dans lesquelles se retrouvent les cellules.

Comment les microtubules pourraient-ils favoriser la déstabilisation des contacts dépendants des cadhérines ? Ivanov et collaborateurs montrent qu'en absence de Ca^{2+}, les cellules SK-CO-15 (cellules épithéliales du colon humain) rompent leurs contacts et réorganisent leur cytosquelette d'actine (Ivanov et al., 2006). Toutefois la dépolymérisation des microtubules inhibe ces effets (figure 35). De plus ces auteurs ont pu montrer que l'inhibition de la kinésine-1 bloquait de manière identique le désassemblage des contacts et qu'elle était capable de co-immunoprécipiter la E-cadhérine et les caténines p120 et β. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les microtubules régulaient le désassemblage des contacts cadhérines par endocytose et que cela nécessitait la kinésine-1.

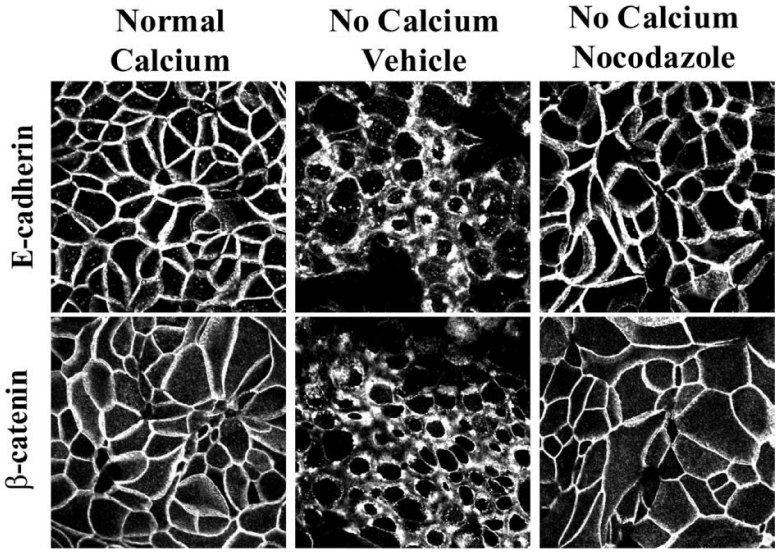


Figure 35 | La dépolymérisation des microtubules atténue le désassemblage des contacts.
Lorsque le milieu de culture des cellules épithéliales SK-CO-15 ne contient pas de calcium (« No calcium, Vehicle ») les contacts se désassemblent, alors qu'en condition contrôle (« Normal calcium ») la E-cadhérine et la β-caténine sont accumulées au niveau des contacts. La dépolymérisation des microtubules (« No calcium, Nocodazole ») empêche ce désassemblage des contacts. Adapté de (Ivanov et al., 2006).

L'ensemble de ces résultats, bien que contradictoire, met bien en évidence une relation entre les cadhérines et les microtubules (voir tableau 3). Cependant cette disparité d'effets indique que des facteurs moléculaires doivent intervenir dans la régulation de la relation cadhérines-microtubules et qu'ils doivent varier en fonction du contexte cellulaire.

Les MT favorisent la…	Drogues	Effets de la perturbation des MT	Cellules	Références
Stabilisation des contacts	Colch.	Diminution de la RET Discontinuité de marquage de ZO-1 et E-cadh aux contacts (mais pas de la vinculine)	Cellules épithéliales de la thyroïde (porc)	(Yap et al., 1995a)
	Noc.	Perturbation de la distribution de la M-cadh Pas d'effet sur l'actine	Myoblastes (pmi28, souris)	(Kaufmann et al., 1999)
	Noc.	Rupture des contacts Diminution de la quantité d'actine et perte des caténines α et β aux contacts	Cellules épithéliales du poumon (triton)	(Waterman-Storer et al., 2000)
	Noc.	Perturbation de l'accumulation de E-cadh aux contacts mais pas de son trafic Perturbation de la localisation et de l'activation de la myosine II	Cellules épithéliales d'adénocarcinome du sein humain (MCF-7)	(Stehbens et al., 2006)
	Noc. Taxol	Perturbation de la reformation des contacts	Cellules épithéliales (PtK2, rongeur)	(Ligon et al., 2007)
Déstabilisation des contacts	Noc.	Accumulation de E-cadh, caténines α et β et de la vinculine aux contacts	Kératinocytes de l'épiderme humain (NHEK)	(Kee et al., 2001)
	Noc. Doc. Pac.	Blocage : du désassemblage des contacts E-cadh et de la réorganisation de l'actine	Cellules épithéliales du colon humain (SK-CO-15)	(Ivanov et al., 2006)
	Noc.	Augmentation de la RET Accumulation de la β-caténine et de l'actine aux contacts	Cellules épithéliales des bronches (H292)	(Lorenowicz et al., 2007)

Tableau 3 | Impacts de la perturbation des microtubules sur les contacts dépendants des cadhérines.
Drogues dépolymérisant les microtubules sont en bleu, les drogues stabilisant les microtubules en noir.
Colch. = colchicine, Doc. = docitaxel, MT = Microtubules, Noc. = nocodazole, Pac. = pacitaxel, RET = Résistance trans-épithéliale.

4. Les RhoGTPases : actrices dans la relation cadhérines-microtubules

Les protéines de la famille des RhoGTPases, telles que RhoA, Rac1 et Cdc42, sont des enzymes dont l'activité est régulée suite à l'engagement des cadhérines (cycle de régulation des Rho GTPases voir figure 36 et (Charrasse et al., 2002; Nelson, 2008; Noren et al., 2003). Les RhoGTPases permettent le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire pour permettre à la cellule par exemple de migrer ou d'établir un contact stable avec sa voisine. De plus en plus d'études montrent que les RhoGTPases peuvent influencer directement la dynamique et le recrutement des microtubules, et inversement. Les RhoGTPases représenteraient donc un élément clé intervenant dans le mécanisme de régulation de la relation cadhérines/microtubules.

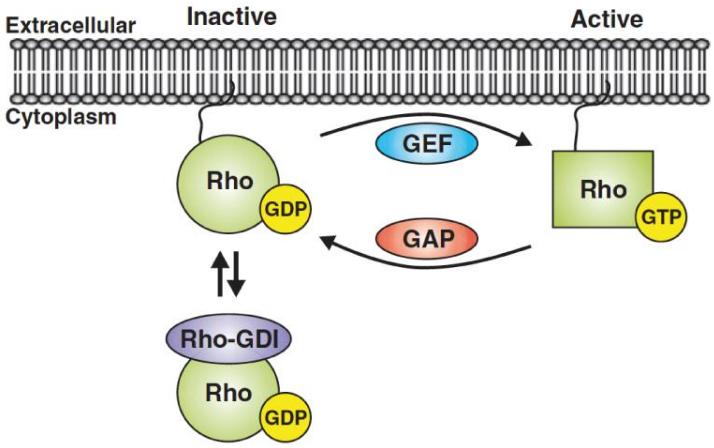


Figure 36 | Cycle de régulation des Rho GTPases.
Les Rho GTPases sont des commutateurs moléculaires : inactives quand elles sont liées au GDP mais actives quand elles sont liées au GTP. Il y a trois classes de protéines régulant ces Rho GTPases : les activateurs **GEF** (Guanine-exchange factor) favorisant les échanges GDP>GTP, les activateurs **Rho GDI** (Rho GDP dissociation inhibitor) séquestrant les Rho GTPases inactives dans le cytoplasme, et les inhibiteurs **GAP** (GTPase-activating protein) favorisant l'hydrolyse du GTP. L'activation des Rho GTPase nécessiterait qu'elles soient localisées à la membrane plasmique. Tiré de (Huveneers and Danen, 2009).

4.1. Les RhoGTPases influencent le cytosquelette de microtubules

L'engagement des cadhérines déclenche une cascade de signalisation passant notamment par l'activation de différentes RhoGTPases, nous avons pu voir que Rac1 était recrutée et activée aux contacts suite à l'engagement des cadhérines (voir chapitre I paragraphe 2.4.3.c.). Rac1 est est activée à la pointe du lamellipode mais est inactive dans les zones de contacts en maturation (Yamada and Nelson, 2007). Des travaux de Wittmann et collaborateurs se sont penchés sur l'étude de l'influence de Rac1 sur les microtubules et ont démontré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Rac1 dans des cellules épithéliales promeut l'avancement de microtubules jusqu'à la périphérie du lamellipode du front de migration de la cellule. Inversement l'expression d'un mutant dominant négatif de Rac1 supprime complètement l'apparition de ces microtubules pionniers.

Comment la protéine Rac1 pourrait-elle réguler la progression des microtubules dans le lamellipode ? L'activation de Rac1 a été démontrée comme inhibitrice de la stathmine via

l'activation de son effecteur PAK1 (p21-activated kinase) qui phosphoryle la stathmine. L'inhibition de la stathmine pourrait promouvoir la croissance des microtubules en diminuant la fréquence de catastrophes (Daub et al., 2001; Gradin et al., 1998; Wittmann et al., 2003; Wittmann et al., 2004) (figure 37). Une autre possibilité est que Rac1 pourrait réguler la dynamique des microtubules en permettant le recrutement d'éléments stabilisateurs des microtubules via ses effecteurs. La protéine IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1) est un effecteur de Rac1 et Cdc42 et permet de réguler les adhésions engageant la E-cadhérine (pour revues (Noritake et al., 2005; White et al., 2012)) (figure 37). IQGAP1 peut lier l'actine mais aussi des protéines associées aux microtubules telles que APC et CLIP-170 et permettrait ainsi de recruter les microtubules au cortex cellulaire via des protéines stabilisatrices des microtubules (Fukata et al., 2002a; Watanabe et al., 2004) (figure 37).

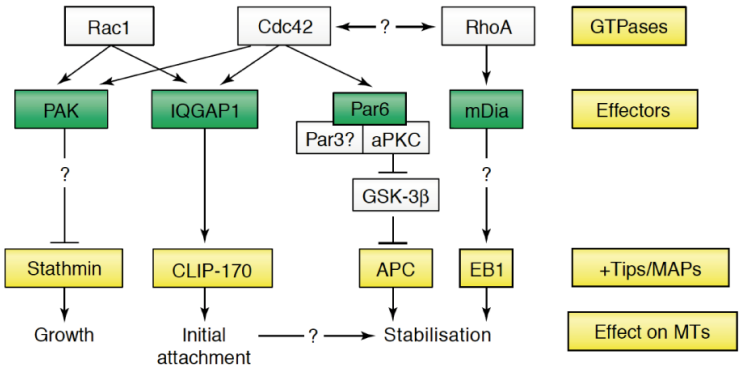


Figure 37 | Modes d'action des Rho GTPases sur la régulation des microtubules.
Tiré de (Fukata et al., 2003).

Les contacts dépendants des cadhérines régulent également l'activation d'une autre RhoGTPAse, la protéine RhoA, qui permettrait la maturation du contact par contraction de l'actomyosine (Yamada and Nelson, 2007). RhoA possède comme effecteur la formine mDia qui est un nucléateur du cytosquelette d'actine (voir chapitre I paragraphe 2.4.3.a.). La protéine mDia induirait la formation de microtubules stables (Palazzo et al., 2001) en interagissant avec les protéines APC et EB1 (Wen et al., 2004), ce qui permettrait la stabilisation des jonctions (Sahai and Marshall, 2002) ou la migration des cellules (Wen et al., 2004). Cette stabilisation des microtubules par mDia serait indépendante de son activité de nucléation de l'actine (Bartolini et al., 2008).

4.2. Les microtubules influencent les RhoGTPases

Les RhoGTPases peuvent être influencées en retour par les microtubules. En effet la dépolymérisation des microtubules peut induire l'activation de la protéine Rac1 et relocaliser Rac1 et Cdc42 dans la cellule (Wittmann and Waterman-Storer, 2001). L'intégrité des microtubules serait donc importante pour l'activation des RhoGTPases. Cependant, comment les microtubules pourraient-ils réguler l'activation des RhoGTPases ?

L'interaction directe entre les microtubules et les RhoGTPases est peu probable étant donné qu'elles ne sont pas retrouvées colocalisées avec les polymères de microtubules (voir (Rodriguez et al., 2003)). Les protéines activant les RhoGTPases, les GEF (figure 36), peuvent quant à elles colocaliser de manière partielle avec les microtubules, ce qui est le cas par exemple pour p190GEF qui est la GEF de RhoA (Glaven et al., 1999; Ren et al., 1998; van Horck et al., 2001). L'activation des RhoGTPases pourrait être régulée par une dépolymérisation localisée des microtubules. Les GEF associées aux microtubules seraient ainsi libérées, et cette hypothèse est avancée notamment pour GEF-H1 qui activerait Rac1 (Wittmann and Waterman-Storer, 2001). La protéine Asef, une autre GEF de Rac1, est capable de s'associer avec la protéine APC et d'être ainsi adressée à l'extrémité (+) des microtubules jusqu'à la pointe du lamellipode, zone d'activation de Rac1 (Kawasaki et al., 2000). Rac1 et les microtubules se régulent en formant une boucle de rétrocontrôle positive. De manière similaire chez la Drosophile, la protéine DRhoGEF2 qui est la GEF de RhoA, peut s'associer avec l'homologue de EB1 et est adressée au cortex cellulaire (Rogers et al., 2004). Les GEF pourraient donc activer les RhoGTPases en étant délivrées par les microtubules, soit par dépolymérisation du microtubule et libération de la GEF, soit (mais peut-être de manière non exclusive) par adressage à l'extrémité (+) des microtubules ciblant des zones spécifiques du cortex cellulaire.

5. Interactions fonctionnelles entre microtubules et actine

Nous allons aborder au cours de cette partie les interactions existant entre l'actine et les microtubules. Nous nous focaliserons sur les données issues de l'étude de la morphogenèse neuronale en raison du grand nombre de résultats existant dans ce domaine à propos de la relation actine/microtubules.

La mise en place de la morphologie neuronale est un processus se déroulant en plusieurs étapes (figure 38). Initialement les neurones ne possèdent pas de neurites et sont entièrement circulaires (stade 1). Ensuite le lamellipode se fragmente en plusieurs lamellipodes qui deviennent des neurites : les neurones sont alors au stade 2 de la morphogenèse neuronale. La dernière étape (stade 3) est la différenciation des neurites en axone et dendrites.

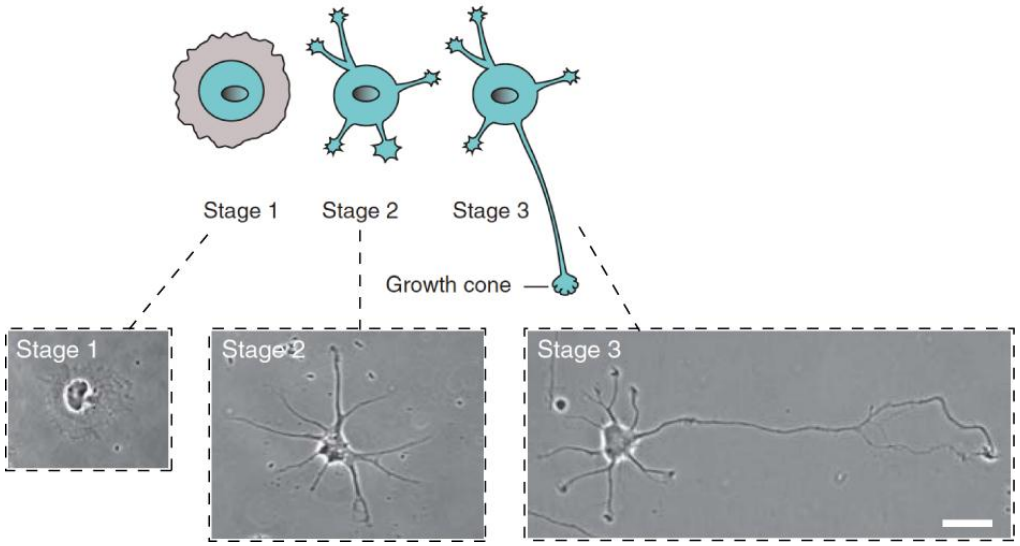


Figure 38 | **Les différents stades de la morphogenèse neuronale.**
Les neurones d'hippocampe sont initialement complètement circulaires avec un lamellipode tout autour de la cellule (zone grise, stade 1) puis se transforment en cellules multipolaires avec plusieurs neurites (stade 2). Ensuite l'un des neurites s'allonge plus rapidement et se différencie en axone tandis que les autres neurites vont maturer en dendrites (stade 3). Barre d'échelle 20 µm. Adapté de (Tahirovic and Bradke, 2009).

Tout au long de ce modelage membranaire l'intervention de l'actine et des microtubules va être très importante pour le bon déroulement de la morphogenèse (pour revue (Poulain and Sobel, 2010)). Nous allons aborder dans cette partie les rôles de la coopération entre l'actine et les microtubules, primordiale dans ce processus morphogénétique.

5.1. Neuritogenèse

Les neurones sont initialement dotés d'un corps cellulaire circulaire, avec un lamellipode riche en actine mais ne contenant pas de microtubules. Dehmelt et collaborateurs ont pu observer que suite à un réarrangement du cytosquelette d'actine ce lamellipode se fragmente en plusieurs lamellipodes dans lesquels les microtubules peuvent pénétrer (Dehmelt et al., 2003). Ces protrusions nouvellement formées s'allongent pour former des neurites qui sont coiffés à leur extrémité par un cône de croissance riche en actine et qui contiennent des microtubules condensés. Dehmelt et collaborateurs ont cherché à identifier un facteur permettant cette réorganisation des cytosquelettes de microtubules et d'actine et ont testé l'impact de MAP2C, un isoforme de la famille des protéines MAP2 qui est également capable, en plus de son rôle stabilisateur des microtubules de lier l'actine (Ozer and Halpain, 2000). MAP2C décore les microtubules envahissant les neurites en formation et sa surexpression dans des cellules Neuro2a induit une augmentation du nombre de neurites. Cependant la stabilisation seule des microtubules par des traitements au taxol ne permet pas de générer des neurites alors que la combinaison du taxol avec une dépolymérisation de l'actine est capable d'induire leur formation. Ces résultats suggèrent que le processus de neuritogenèse nécessite une action combinée des microtubules et de l'actine.

Comment ces deux acteurs permettraient-ils précisément de provoquer l'émergence de neurites à partir d'un corps cellulaire circulaire ? Des travaux réalisés dans le laboratoire de Frank Gertler mettent en évidence par l'utilisation de souris mutantes pour les trois protéines murines de la famille Ena/VASP (Mena, VASP et EVL), que les neurones corticaux provenant de souris déficientes ne sont pas capables de former des structures câblées d'actine ainsi que des filopodes (Kwiatkowski et al., 2007) empêchant l'initiation de la formation de neurites. Des travaux issus du même laboratoire et publiés en parallèle suggèrent que la formation de filopodes est un prérequis pour l'initiation neuritique (Dent et al., 2007). Dans des cellules déficientes pour les protéines de la famille Ena/VASP, la neuritogenèse peut être restaurée par la surexpression de la formine mDia2, sauf quand celle-ci est constitutivement active. Dans un contexte non-neuronal, la protéine mDia est capable de stabiliser les microtubules (Palazzo et al., 2001), provoquant une augmentation de la quantité de microtubules glutamylés. Les auteurs ont donc éprouvé l'influence des microtubules au cours de la neuritogenèse par des traitements au nocodazole et au taxol, et ont pu observer que cela ne modifiait en aucun cas le nombre de filopodes mais empêchait aux neurones de différencier leurs neurites en axones et dendrites (figure 39). Dent et collaborateurs ont en donc conclu que la formation de filopodes était nécessaire mais pas suffisante pour l'étape de neuritogenèse, requérant la présence de microtubules dynamiques.

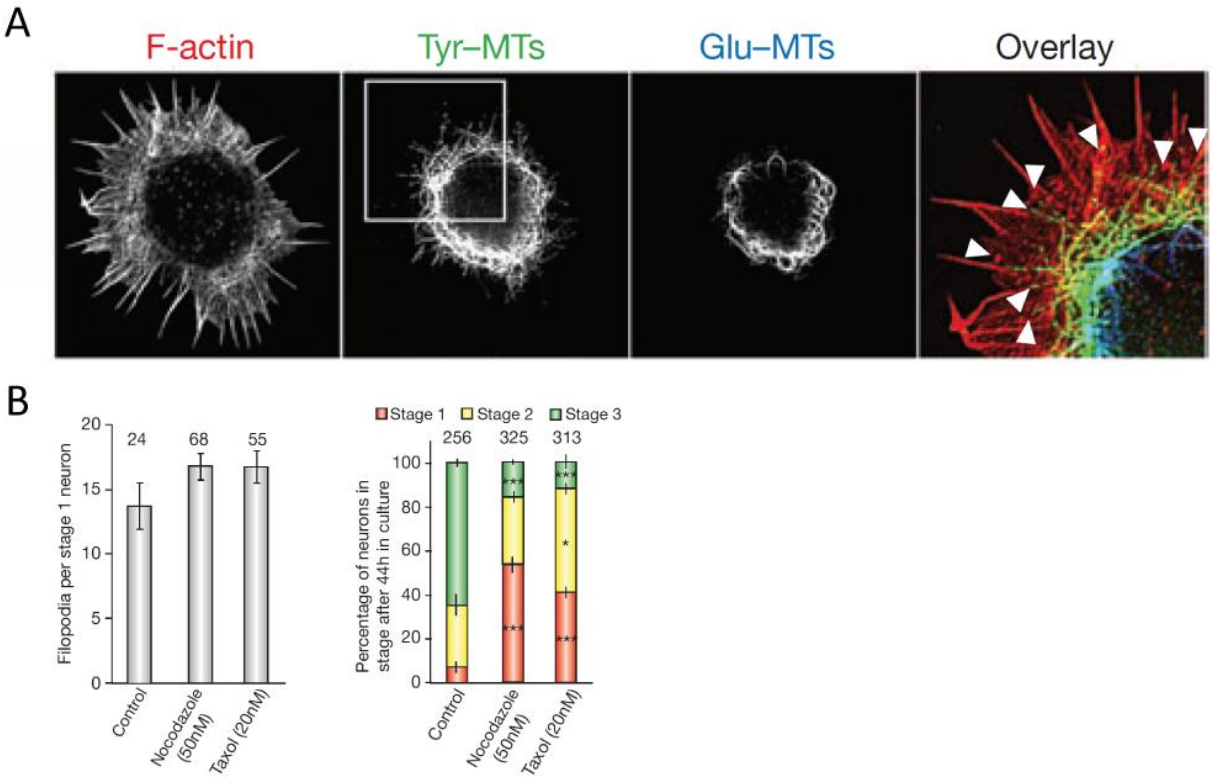


Figure 39 | Les microtubules sont nécessaires pour le développement neuronal.
Les travaux de Dent et collaborateurs ont mis en évidence grâce à des souris mutantes que les protéines Mena/VASP étaient nécessaires à la neuritogenèse. Ils se sont également intéressés aux microtubules et ont pu constater que certains microtubules tyrosinés (Tyr-MTs), dits dynamiques, étaient capables de pénétrer dans les zones riches en actine des lamellipodes de neurones corticaux au stade 1 (A). Les microtubules considérés comme stables (microtubules glutamylés, Glu-MTs) quant à eux restent en arrière du lamellipode (A). Dent et collaborateurs ont perturbé les microtubules par des drogues les dépolymérisant (nocodazole) ou les stabilisant (taxol). Ils ont découvert que cela ne modifiait pas de manière significative le nombre de filopodes qui sont requis pour la neuritogenèse (B, histogramme de gauche) mais que cela diminuait le nombre de neurones réussissant à atteindre le stade 3 du développement neuronal. Adapté de (Dent et al., 2007).

Ces travaux démontrent que la combinaison de l'action de l'actine et des microtubules est essentielle pour la neuritogenèse. Burnette et collaborateurs démontrent dans le modèle de neurones d'Aplysie que cette actine filopodiale ne serait pas nécessaire à la pénétration des microtubules mais leur servirait de guide (Burnette et al., 2007) (figure 40). Des expériences de GST pull-down et de FRET ont permis d'identifier un lien moléculaire entre l'actine et les microtubules. Geraldo et collaborateurs ont montré que EB3 et la protéine drebrine (Developmentally regulated brain protein), une protéine liant l'actine, peuvent interagir directement (Geraldo et al., 2008) (figure 40). L'inhibition de leur interaction perturbe la pénétration des microtubules dans les filopodes, la croissance neuritique ainsi que la formation de cônes de croissance. L'adressage des microtubules dans les filopodes semble donc être important pour initier la neuritogenèse. Cette hypothèse est confirmée par des travaux effectués dans un contexte non neuronal, démontrant que le ciblage des microtubules dans les filopodes de cellules de mélanome de souris (cellules B16F1) permettrait la réorganisation de l'actine. De plus EB1 coordonnerait les microtubules et l'actine permettant la régulation de la motilité de ces cellules (Schober et al., 2007; Schober et al., 2012).

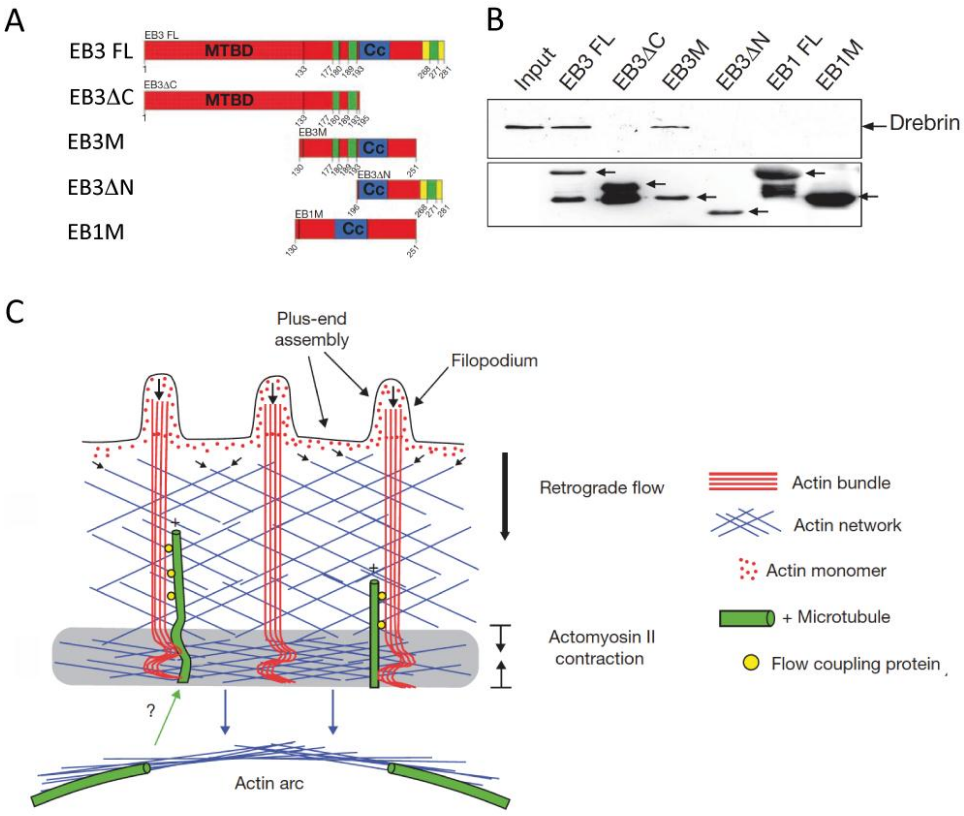


Figure 40 | Interaction moléculaire entre les microtubules et l'actine.
A : Geraldo et collaborateurs ont réalisé des expériences d'immunoprécipitations de différentes constructions des protéines EB3 et EB1 à partir d'extraits de cytosol de cônes de croissance. FL : full-length, ΔC : délétion du domaine carboxy-terminal, M : délétion du domaine de liaison aux microtubules, ΔN : délétion du domaine amino-terminal, MTBD : microtubule-binding domain, Cc : coiled-coil. **B :** Résultats de ces immunoprécipitations : le blot du haut est révélé avec un anticorps anti-drebrine, tandis que celui du bas révèle les différentes contructions immunoprécipitées (flèches). Seule la protéine EB3 peut interagir avec la drebrine, une protéine s'associant à l'actine, grâce à ses régions amino et carboxy-terminales. **C :** Représentation schématique du comportement des microtubules (vert) dans les cônes de croissance qui sont guidés grâce à un couplage à l'actine filopodiale (rouge). L'actine branchée (bleu) montre un flux rétrograde et qui peut ainsi ramener également les microtubules vers l'arrière du cône de croissance. Le mécanisme permettant le passage des microtubules des arcs d'actine aux filopodes n'est pas encore connu. Adapté de (Burnette et al., 2007; Geraldo et al., 2008).

5.2.Croissance axonale

Suite à l'émergence des neurites du corps cellulaires et à leur croissance, les neurites se différencient en axones et dendrites. La protéine APC a été démontrée comme régulatrice de la polarisation neuronale (voir §…), de la croissance et du branchement axonaux (Zhou 2004, Chen 2011 Plos one). En effet APC promeut l'assemblée des microtubules lorsque son inhibition induite par la phosphorylation par la protéine GSK-3β est levée (Votin et al., 2005; Zhou et al., 2004). APC est une protéine qui peut être localisée dans des zones riches en actine (Watanabe et

al., 2004) et également interagir avec l'actine. En effet Moseley et collaborateurs ont mis en évidence notamment par des expériences de culottage de l'actine à faible vitesse que APC était présent dans le culot d'actine et qu'APC était également capable de compacter les filaments d'actine entre eux (Moseley et al., 2007). La liaison d'APC avec l'actine serait effectuée via son domaine basique en région carboxy-terminale mais serait inhibée par une interaction entre APC et EB1, suggérant qu'APC ne serait pas capable de lier les microtubules à l'actine dans un même complexe.

Comment APC pourrait-elle réguler l'organisation de l'actine ? Okada et collaborateurs, dans des cellules de la lignée neuronale PC-12, proposent qu'APC recrute des monomères d'actine et servirait de complexe de pré-nucléation. Ensuite la protéine mDia prendrait le relai en utilisant l'amorce ainsi formée et stimulerait l'assemblage des microfilaments (Okada et al., 2010). Ces résultats décrivent l'impact d'APC dans la voie de signalisation impliquant la protéine GSK-3β. Cependant la liaison d'APC à l'actine pourrait être régulée également via une voie dépendante des kinases MAPK/ERK, dont la phosphorylation inhiberait l'interaction d'APC avec l'actine mais pas celle avec les microtubules (cellules NIH3T3, (Caro-Gonzalez et al., 2012). La liaison d'APC aux différents partenaires du réseau de microtubules et d'actine semblerait ainsi résulter de la balance de deux voies de signalisation, impliquant GSK-3β ou MAPK/ERK.

D'autres protéines des bouts plus des microtubules ont été révélées comme importantes dans ces relations actine-microtubules. En effet les protéines de la famille **CLASP**, et plus particulièrement CLASP2 qui est essentiellement exprimée dans le système nerveux, sont connues pour leurs rôles dans le guidage axonal et la régulation de la croissance axonale (Galjart, 2005; Hur et al., 2011; Lee et al., 2004; Mimori-Kiyosue et al., 2005)). Ces protéines CLASP ne sont pas uniquement capables de se lier aux microtubules mais peuvent co-immunoprécipiter avec l'actine et être localisées le long des fibres de stress, pouvant montrer un flux rétrograde dans le lamellipode et les filopodes de fibroblastes et de neurones de la corde spinale chez le Xénope, respectivement (Tsvetkov et al., 2007). Cette association à l'actine se ferait via les domaines amino-terminal et de liaison aux microtubules de CLASP et permettrait selon les auteurs de faciliter la reconnaissance des filaments d'actine par les extrémités plus des microtubules. De plus des travaux effectués dans des neurones de ganglions de la racine dorsale ont suggéré que la protéine CLASP avait besoin de l'activité de la myosine II pour exercer sa fonction au cours de la croissance axonale (Hur et al. 2011), appuyant l'importance du rôle de CLASP dans l'association actine-microtubules. Cependant le mécanisme moléculaire précis ainsi que sa pertinence au cours de la croissance neuritique restent encore à être prouvés. Le rôle des protéines **CLIP** dans la régulation de la croissance et de la polarisation axonales a été également rapportée. L'utilisation de mutants à caractère dominant négatif des protéines CLIP perturbe la croissance axonale et la pénétration des microtubules dans le cône de croissance mais l'inhibition est levée par la dépolymérisation de l'actine et l'inhibition de la myosine II (Neukirchen and Bradke, 2011a).

L'interaction des cadhérines avec les microtubules est régulée de manière complexe, pouvant soit être directe, soit faisant intervenir des acteurs comme les Rho GTPases et l'actine. Ce type de relation amène une lumière nouvelle sur la régulation de la formation des contacts ainsi que sur l'impact des cadhérines sur le cytosquelette.

Au cours de cette introduction, nous avons pu voir que les complexes cadhérine/caténines régulaient le cytosquelette d'actine afin de d'établir et de maintenir des contacts intercellulaires, phénomène primordial pour le développement de tout organisme. Toutefois les complexes adhésifs seraient également capables d'influencer les microtubules, autre élément du cytosquelette, et cela participerait à la génération des contacts intercellulaires. Cependant les mécanismes de régulation sont encore mal connus et restent à être élucidés. Pendant ma thèse je me suis penchée sur l'analyse de la relation N-cadhérine – microtubules, plus précisément sur l'influence de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules au cours de la formation des contacts intercellulaires. J'ai eu la chance de pouvoir étudier cette association dans deux systèmes différents, dans des cellules C2C12, une lignée myogénique de souris pouvant établir des contacts stables, et dans des neurones d'hippocampe de rat, dont les adhésions dépendantes des cadhérines sont très dynamiques et associés à une forte migration. J'ai cherché à comprendre comment les contacts dépendants de la N-cadhérine régulaient le recrutement et la dynamique des microtubules et en retour si les microtubules étaient nécessaires à la formation des adhésions N-cadhérine. Nous verrons dans les résultats obtenus que ces phénomènes de régulation N-cadhérine/microtubules sont complexes et très variables selon le contexte cellulaire étudié.

Résultats

RESULTATS

Présentation des travaux

Les cadhérines sont des acteurs essentiels de la formation et du maintien des contacts intercellulaires. Leur relation avec le cytosquelette d'actine est essentielle pour que les cellules puissent établir et renforcer leurs adhésions, mais également pour qu'elles puissent migrer. L'implication dans ces processus d'un autre élément du cytosquelette, les microtubules, a été pendant longtemps négligée. Pourtant les microtubules pourraient, être recrutés et capturés au niveau des contacts intercellulaires (Ligon et al., 2001; Stehbens et al., 2006) , ces contacts pouvant également réguler la dynamique des microtubules (Chausovsky et al., 2000; Waterman-Storer et al., 2000). En retour, des études ont rapporté que les microtubules pouvaient soit favoriser la formation des contacts, soit au contraire induire leur déstabilisation (Ivanov et al., 2006; Kee and Steinert, 2001; Lorenowicz et al., 2007).

Cependant les données existantes sont peu nombreuses et contradictoires, et semblent être dépendantes du type cellulaire étudié. Pour mieux comprendre la nature exacte de la relation cadhérine-microtubules, j'ai entrepris d'étudier dans un système permettant d'induire spécifiquement des adhésions dépendantes de la N-cadhérine, l'impact de l'engagement de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules. Pour cela j'ai analysé la réponse des microtubules dans deux contextes cellulaires différents que sont les adhésions cellulaires stables établies par des cellules myogéniques, et les adhésions dynamiques formées lors de la croissance neuritique de neurones embryonnaires d'hippocampe de rat. Ces travaux seront développés dans l'ordre suivant :

1ère partie, article en préparation

Influence de la N-cadhérine sur la dynamique et le recrutement des microtubules au cours de la formation de contacts stables

N-cadherin limits the recruitment and dynamics of microtubules at cell-cell contact through acto-myosin. En préparation, The Journal of Cell Science.

2ème partie

Influence de la N-cadhérine sur le réseau de microtubules au cours de la croissance neuritique

Travail en cours.

Les compétences que j'ai acquises au cours de ma thèse m'ont permises de participer à un autre projet de l'équipe portant sur l'étude du rôle de la N-cadhérine au cours des processus de survie neuronale (**travail annexe,** collaboration avec Hélène Birbes). Ce projet a débouché sur une publication dans le journal Plos One en 2012.

Première partie

N-cadherin limits the recruitment and dynamic of microtubules at cell-cell contact through acto-myosin.

Charlotte Plestant, Pierre-Olivier Strale, René-Marc Mège.

1ère partie (article en préparation) : Influence de la N-cadhérine sur la dynamique et le recrutement des microtubules au cours de la formation de contacts stables

N-cadherin limits the recruitment and dynamic of microtubules at cell-cell contact through acto-myosin.

Charlotte Plestant, Pierre-Olivier Strale, René-Marc Mège.
Article en préparation pour une soumission à The Journal of Cell Science.

L'établissement des contacts intercellulaires est un processus nécessitant le recrutement et l'engagement des cadhérines. L'ancrage de ces récepteurs d'adhésion au cytosquelette d'actine induit un remodelage de cet élément du cytosquelette, permettant ainsi de stabiliser et renforcer les contacts (Lambert et al., 2007 ; Mege et al., 2006). Les mécanismes d'interaction entre les cadhérines et l'actine ne sont pas encore entièrement élucidés : le mode d'association des cadhérines à l'actine via ses partenaires intracellulaires, les caténines, est un sujet encore débattu (Taguchi et al., 2011; Yamada et al., 2005; Yonemura et al., 2010). De nombreux autres paramètres peuvent influencer les contacts intercellulaires, tel que les microtubules, un autre élément du cytosquelette. Les microtubules jouent des rôles très importants notamment au cours des processus de transport intracellulaire et de division cellulaire. La haute instabilité dynamique qui les caractérise leur permet d'explorer l'espace cytoplasmique incluant l'espace jouxtant les contacts cellule matrice et cellule-cellule (Stehbens et al., 2006).

Plusieurs études suggèrent que les contacts intercellulaires permettraient la stabilisation des microtubules (Chausovsky et al., 2000; Waterman-Storer et al., 2000) et les recruteraient afin de stabiliser les contacts (Stehbens et al., 2006) ou encore de délivrer des composants à la membrane (Shaw et al., 2007). Inversement d'autres études ont démontré que les microtubules pouvaient avoir un effet déstabilisateur sur les contacts dépendants des cadhérines (Ivanov et al., 2006; Kee and Steinert, 2001; Lorenowicz et al., 2007). Ces résultats contradictoires nous ont amenés à nous questionner au sujet de l'influence de l'adhésion dépendante des cadhérines sur le cytosquelette de microtubules dans les cellules myogéniques C2C12 (Yaffe and Saxel, 1977). Pour cela nous avons eu recours à l'utilisation de substrats biomimétiques développés dans l'équipe (Lambert et al., 2000) afin d'engager spécifiquement l'adhésion dépendante de la N-cadhérine.

Pour connaître l'impact de l'engagement de la N-cadhérine sur le recrutement nous avons étalé des cellules C2C12 sur des substrats de N-cadhérine recombinante et quantifié la pénétration des microtubules dans les zones d'adhésion formées par les cellules. Nous avons pu constater que les adhésions dépendantes de la N-cadhérine diminuaient le taux de pénétration ainsi que la vitesse moyenne de progression des microtubules dans les zones de contact.

Afin de comprendre quel(s) facteur(s) pouvai(en)t freiner les microtubules dans leur progression dans le lamellipode, nous nous sommes intéressés au cytosquelette d'actine. En effet dans ce système cellulaire lorsque les cellules établissent des contacts N-cadhérine dépendants, les filaments d'actine sont fortement recrutés et (i) distribués sous forme de câbles radiaux et (ii) d'arcs contractiles parallèles à la périphérie de la cellule (Lambert et al., 2007). Lors de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par des traitements avec de la cytochalasine D la vitesse moyenne des microtubules est restaurée. Cependant l'inhibition de la myosine II par de la blebbistatine diminue encore plus la vitesse de déplacement des microtubules. Ces résultats suggèrent donc que l'engagement de la N-cadhérine régule de manière négative la dynamique des microtubules et que ce processus est étroitement lié au système d'acto-myosine.

Nous avons ensuite émis l'hypothèse que l'impact de l'actine sur la dynamique des microtubules était dû au flux rétrograde d'actine. La vitesse moyenne de ce flux rétrograde a été analysée après transfection des cellules par la sonde Lifeact (Riedl et al., 2008). Nous avons pu constater que l'engagement de la N-cadhérine stimulait fortement ce flux rétrograde d'actine, et ceci de manière dépendante de la myosine II. Ces résultats suggèrent donc que la N-cadhérine inhiberait la pénétration et la dynamique des microtubules à la fois en formant un arc d'actine contractile et en stimulant le flux rétrograde d'actine.

Nous avons voulu ensuite connaître l'impact des microtubules sur les contacts réalisés par la N-cadhérine. Pour cela nous avons dépolymérisé ou stabilisé les microtubules respectivement par des traitements au nocodazole et au taxol pendant ou après l'étalement des cellules C2C12 sur substrat N-cadhérine. Ces traitements ne perturbent pas l'adhésion et l'étalement des cellules et ne les dissocient pas du substrat. Ces résultats suggèrent que les microtubules ne sont pas indispensables pour la formation de contacts cellulaires à court terme. Cependant nous avons quantifié la quantité de β-caténine accumulée dans les zones de contact et nous avons pu constater que les traitements au taxol augmentaient l'accumulation de la β-caténine. Ces expériences mettent en évidence un effet possible des microtubules sur le renforcement des contacts intercellulaires en agissant sur l'accumulation de la N-cadhérine.

Ces résultats montrent pour la première fois l'impact spécifique de l'adhésion dépendante de la N-cadhérine sur le recrutement et la dynamique des microtubules. Nous proposons un modèle de régulation des microtubules aux contacts intercellulaires faisant intervenir les filaments d'actine. Suite à son engagement, la N-cadhérine induirait un remodelage du réseau d'actine et stimulerait son flux rétrograde et la formation d'un arc contractile d'acto-myosine. Ce flux rétrograde d'actine, mais surtout l'arc contractile inhiberait la progression des microtubules dans les zones d'adhésion. Nous proposons que cette inhibition de la pénétration des microtubules soit un moyen d'empêcher les microtubules de limiter l'accumulation des cadhérines au contact.

Voici l'article que nous allons soumettre.

1. Abstract

Engagement of cadherin at cell-cell contacts either drive the re-enforcement of these contacts leading to the formation of stable intercellular junctions or maintain cell contact instability during cell-cell intercalation and cell migration. The mechanisms leading to these opposite cell responses are not fully understood but involve coordination between plasma membrane adhesion to the surrounding environment and cytoskeleton remodeling. Well-known actors of this process are cadherins and catenins that are part of a multi-molecular complex linking the cell membrane to the underlying microfilaments. Another element of this plasticity may be the microtubule network (MT) working in functional interaction with cadherins and actin. However, the relationship between cadherins and MTs is still unclear and subject to controversy. We investigate here the relationship between N-cadherin and MTs during stable cell-cell contact formation. We use spreading of myogenic C2C12 cells on recombinant N-cadherin to analyze the effect of cadherin engagement on MT distribution and dynamics. Newly formed MTs were redirected toward adhesion sites by their +TIPs shortly after cell contact initiation. However, these MTs neither aligned nor colocalized with cadherin adhesions. A quantification analysis revealed a dramatic inhibition of the MT penetration in cadherin adhesions compared to fibronectin (FN) adhesions, an inhibition that was alleviated by the expression of a dominant negative form of N-cadherin. This inhibition paralleled a significant reduction of MT +ends forward movement. In addition we observed that N-cadherin engagement induced a two-fold stimulation of actin tread milling, suggesting that forward actin movements may relay the inhibition of MT penetration and dynamics elicited by N-cadherin engagement. We thus investigated the implication of actin filaments in the response of MTs to N-cadherin engagement. Treatment with cytochalasin D increased the speed of MT +ends forward movement. In contrast, inhibition of myosin II activity with blebbistatin, which blocks the actin tread-milling, induced an increased inhibition of MT +TIPs mean velocity, suggesting that the two processes are not directly linked. Interestingly, most of the MTs of cells spread on N-cadherin turned tangentially and did not pass through the acto-myosin belt present at the rear of the adhesion zone. In accordance, the destabilization of the actin network by cytochalasins or blebbistatin triggered an increased penetration of MTs in cadherin adhesion areas, likely unraveling an obstructive effect of tangential actin bundles on MT penetration independently of MT dynamics. In turn, we observed that N-cadherin mediated contacts form independently of MTs but that the blockade of MT dynamics by taxol induced a strengthening of cadherin adhesions. Altogether, these results establish a complex functional cross-talk between N-cadherin adhesion and MT organization during cell-cell contact reinforcement

2. Introduction

During normal development and in pathological manifestations such as cancer, opportunistic cell-cell contacts either drive the re-enforcement of these contacts leading to the formation of stable intercellular junctions, or at the opposite maintain cell contact instability leading to cell-cell intercalation or even long distance cell migration. Despite their importance, the mechanisms leading to these opposite cell responses are only partially understood. Indeed they involve a coordination of complex processes such as plasma membrane adhesion to the surrounding environment and cytoskeleton remodeling, regulation of the local membrane stability and intracellular traffic. Well-known actors of this process are cadherins, catenin and actin that are part of the multi-molecular complex linking the cytoskeleton, the cell membrane and the surrounding environment (Niessen et al., 2011). Another element of this plasticity may be the microtubule network (MT) working in functional interaction with cadherins and actin. However, the relationship between cadherins and MTs is still unclear and subject to controversy.

Cadherins are homophilic intercellular adhesion receptors that bind intracellular partners such as catenins p120, α and β, allowing the dynamic anchoring of the adhesive complex to the actin cytoskeleton (Giannone et al., 2009; Mege et al., 2006). E-cadherin induces the formation of stable intercellular adherens-like type of junctions in epithelial cells (Gumbiner et al., 1988; Harris and Tepass, 2010; Mege et al., 1988). Another cadherin, N-cadherin, mostly expressed in neuronal, and cardiac or skeletal muscles, triggers more pleiotropic cells responses. Indeed, N-cadherin is responsible of the formation stable intercellular junctions such as intercalated disks in the heart (Radice et al., 1997), adherens junctions at the apical side of neuroepithelial cells (Kadowaki et al., 2007) and central nervous system synapses (Uchida et al., 1996). At the opposite, this molecule induces the migration of embryonic neuronal precursors (Franco et al., 2011; Jossin and Cooper, 2011; Kawauchi et al., 2010) as well as growth cone migration at the tip of differentiating neurons (Bard et al., 2008; Boscher and Mege, 2008). Interestingly, epithelia-derived cancer cells loose E-cadherin expression or function during an Epithelio-Mesenchymal Transition (EMT) process in their progression toward malignancy (Cowin et al., 2005). Some of these cells gain expression of N-cadherin during this process, the expression of which is associated with the acquisition of migratory properties independently of E-cadherin expression (Berx and van Roy, 2009; Hazan et al., 2004). The underlying molecular mechanisms of these pleitropic responses to cadherin engagement are not known at the moment but may involve a differential anchoring of cadherin to actin networks (Giannone et al., 2009), co-activation of growth factor receptors (Hazan et al., 2004) as well as cadherin ectodomain glycosylation (Jamal et al., 2009).

Another underscored key but emerging actor of this cellular plasticity is the microtubule network in functional interaction with both cadherins and actin (Harris and Tepass, 2010; Stehbens et al., 2009). MTs are polarized polymers irradiating from the centrosome and exploring the cytoplasmic space through their highly dynamic plus end, participating to the maintenance of the cell morphology and allowing the intracellular transport of vesicles along them thanks to associated motors. In polarized epithelial cells however some noncentrosomal MTs are unusually directed by their minus end to the apical junctional complexes (Bacallao et al., 1989). It has been reported recently that these MTs are anchored to adherens junctions, thanks to proteins named PLEKHA7 and Nezha (Meng et al., 2008). In addition, cadherin adhesion has been reported to influence MT dynamics of these noncentrosomal MTs by stabilizing their minus

extremities (Chausovsky et al., 2000) likely through the action of α-catenin (Shtutman et al., 2008). Alternatively, including epithelial cells, centrosomal MTs are oriented toward the cell cortex and in particular to cadherin mediated contacts by their plus end (Ligon et al., 2001; Shaw et al., 2007; Stehbens et al., 2006). It has been proposed that these MT plus ends could be at least transiently anchored to adhesion areas via +TIPs associated proteins such as dynein (Ligon and Holzbaur, 2007; Ligon et al., 2001), CLIP-170 (Stehbens et al., 2006), $p150^{Glued}$ (interacts with β-catenin) (Shaw et al., 2007) or IQGAP1 (Fukata et al., 2002a; Watanabe et al., 2009). These MTs would then favor the delivery of cadherin containing vesicles to the plasma membrane thanks to an association of cadherin/catenins complexes with kinesins (Chen et al., 2003; Mary et al., 2002; Teng et al., 2005) and/or the delivery of other junctional proteins (Shaw et al., 2007).

However, most of these studies report on the relation between E-cadherin-mediated adherens junctions and MTs in epithelial cells and no data exist on the cadherin/MT relationship in other cell type or for another type of cadherin. Thus we thought to analyze here the influence of N-cadherin engagement on MT recruitment and dynamics in myogenic cells, thanks to the study of stable cell-cell contacts established between these cells and biomimetic substrates coated with recombinant N-cadherin (Lambert et al., 2000). MT penetration, stability and dynamics were analyzed by fixed and live cell imaging, unraveling an unexpected inhibitory effect of N-cadherin engagement on the both the recruitment and the dynamics of MT +end in these cells. Conversely we discovered that N-cadherin engagement at the opposite stimulates the actin retrograde flow and the formation of an acto-myosin belt at the rear of the adhesion zone. Pharmacological alteration of the acto-myosin system indicated that the contractile arc of actin tangential to the cell edge was the main obstacle to MT +TIP penetration in cadherin adhesions. Next we tested the impact of MT integrity on N-cadherin adhesion formation and maintenance. Cadherin adhesions form independently of the presence of MTs and are at the opposite stabilized by the inhibition of MT dynamics. Altogether, these results establish a complex functional cross-talk between N-cadherin adhesion and MT organization during cell-cell contact reinforcement.

3. Experimental procedures

Cell culture and electroporation

Mouse myogenic C2C12 cells (Yaffe and Saxel, 1977) and Human HEK-293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 100 UI/ml of penicillin/streptomycin at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. For the experiments requiring exogenous protein expression, cells were electroporated 24 hours before use with the Equibio Easyject Plus electroporator (Wolf laboratories). For each electroporation, 5.10^6 cells were mixed with 30 µg of expression vector, 20 µg of sperm salmon DNA in the culture medium buffered with 15 mM HEPES, pH 7.2. The electroporation settings used for the C2 and HEK-293 cells were 260V/1600F and 200V/900F, respectively.

Plasmids, antibodies and drugs

The EB3-GFP construct was obtained from F. Niedergang, Institut Cochin, Paris. The EB1-GFP and EB3-mCherry constructs were obtained from A. Andrieux, Institut des Neurosciences, Grenoble. LifeAct-GFP, DN Ncad constructs were described in (Riedl et al., 2008), (Lelièvre et al., 2010) respectively. Rabbit polyclonal anti-β-catenin antibodies (Sigma), monoclonal anti-N-cadherin (Zymed), anti-EB1 (BD Biosciences), anti-α-tubulin (Sigma), anti-acetylated α-tubulin (Sigma) and anti-tyrosinated α-tubulin (Sigma) antibodies were used in this study. Alexa-643 phalloidin was obtained from Molecular Probes. Drug treatments were performed through 20 minutes incubation with cytochalasin B (Sigma), cytochalasin D (Fluka), blebbistatin (Calbiochem), nocodazol (Sigma) and taxol (Sigma).

Production and purification of Ncad-hFc recombinant protein

The production and purification of the recombinant Ncad-hFc protein was adapted from Lambert et al., (Lambert et al., 2000). HEK-293 cells were electroporated with pCEP4/Ncad-Fc. Then, the recombinant protein was harvested every other day in DMEM supplemented with 250 µg/ml BSA, and purified from the conditioned medium using a protein G-coupled sepharose bead column (Fast flow GE Healthcare). The Ncad-Fc purity and concentration was followed by a Coomassie blue stained SDS-PAGE gel using a purified Fc fragment standard range.

Substrate coating, micro patterns and cell spreading assays

Nitric acid cleaned glass coverslips were first coated with Sigmacote (Sigma Aldrich) then with either fibronectin or Ncad-Fc as described in Gavard et al, (Gavard et al., 2004).
For micro pattern printing, a solution of PDMS (Polydimethylsiloxane, Sylgard, Dow Corning) was poured on a “wafer” and let polymerized at 60°C overnight. The PDMS stamps were incubated face up for 45 minutes at room temperature with a mixture of fibronectin and cy3-conjugated IgG. After several washes with deionized water, the stamps were dried and applied onto silanized glass coverslips, then the printed areas were blocked with 3% BSA- 0.1% Pluronics (Life Technologies) for 1 hour at room temperature. C2C12 cells mechanically dissociated with cold PBS, 1.5% BSA, 3.5 mM EDTA were then plated on the different substrates

at 2.10^4 cell/cm^2. Cells were incubated during 2 hours at 37°C, 5% CO_2 for classical substrate coating and overnight for the micro patterns.

Immunostainings and image acquisitions

Cell preparations were fixed for 15 minutes with 37°C pre-warmed PBS containing 4 % formaldehyde, 0.33 M sucrose for most of the stainings or with -20°C pre-cold methanol for 10 minutes for microtubule +TIP protein stainings. Fixed preparations were permeabilized by incubation with 0.15% Triton X-100 in PBS for 5 minutes and saturated by incubation with 1.5% BSA in PBS for 1 hour, then incubated with primary antibodies in PBS-1.5% BSA for 2 hours at room temperature. The secondary antibodies (Jackson Laboratories) were incubated for 1 hour and Alexa647-phalloidin (Molecular Probes) for 45 minutes when actin labeling was required. The preparations were observed with a 63X objective by epifluorescence microscope (DM 6000 Leica) and images captured with a Micromax CCD camera (Roper Scientific) driven by the MetaMorph software or by confocal microscopy (Fv10i, Olympus; SP5, Leica).

Spinning disk acquisitions

For live imaging the medium was replaced 30 minutes before acquisition by DMEM-F12 medium (Gibco) containing 10 mM HEPES, 0.54 % glucose, 2mM glutamine, 2 mM sodium pyruvate. Acquisitions were performed on an inverted microscope Leica DMI4000 using a 63X objective coupled to a spinning disk confocal module (CS20 head, Yokogawa) and thanks to an intensified CCD camera (Quantem S12SC, Roper Scientific), driven by MetaMorph. Images were acquired every 100 or 500 ms at the excitation wavelengths 491 and 561 nm, exposure time 100 ms. The temperature was maintained at 37°C thanks to (thermostated box, Life Imaging).

Image analysis, quantification and statistics

Quantitative Image analyses were performed with NIH ImageJ software and statistics with GraphPad Prism software.
The surfaces occupied by MTs were determined on preparations of cells double-stained for β-catenin, revealing the whole cell surface, and tyrosinated tubulin, revealing the MTs. For each analyzed cell, acquired images were thresholded, then binarized to extract the surface occupied by both signal for each cell. Quantification was performed over 3 independent experiments with approximately 10 cells for each condition. Individual microtubule penetration was calculated as the ratio of the microtubule penetration distance in the adhesion area on the width of the adhesion area and expressed as a percentage. The final results were reported as a frequency of the number of microtubules in function of their penetration in the adhesion area. Quantification was performed over 2 independent experiments with approximately 200 microtubules for each condition. For the determination of the mean speed displacement of MT +Tips, instantaneous displacement of MT +Tips were determined frame by frame (acquisition every 500ms to 1s) by manual tracking of the EB3 comets thanks to the MTrackJ plugin (Meijering et al., 2012). The mean speed displacements were then calculated for each comet over approximately 5 to 10 frames. The quantifications were performed over 3 independent experiments, with 5 cells and 20 comets per cell. The mean speed of the actin retrograde flow was extracted by kymograph analysis from spinning disk acquisitions of cells transfected by a fluorescent LifeAct construct. A line of 1 pixel large has been drawn in a region of interest of the cell in order to generate a

kymograph with ImageJ software, giving a 2D representation of the time and the distance of the fluorescent signal. The mean speed of the retrograde flow of actin was obtained by calculation of the slope values of the fluorescence signals. β-catenin accumulation after drug treatments was quantified by measuring the mean fluorescence intensity of β-catenin staining inside radial accumulations of cells plated on Ncad-Fc substrates after removal of the fluorescence background.

Western Blot

Whole cell extracts were obtained by lysing cells into cold RIPA buffer (10 mM NaPO4 buffer, pH 7.8, 60 mM NaCl, 1% Triton X100, 10% glycerol, 25 mM β-glycerol-phosphate, 50 mM sodium fluoride, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (Complete, Roche)). Lysates were vortexed 15 min at 4°C and cleared by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Equal amounts of proteins (10 to 25 µg estimated by micro-BCA kit, Pierce) were subjected to SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. After transfer at 4°C, membranes were blocked with 5% nonfat milk and were incubated with the corresponding primary antibody and next, with IRDye-coupled secondary antibody (Rockland) against rabbit or mouse immunoglobulins, which were detected with Odyssey Imaging System (LY-COR Biosciences). The membranes were reprobed with an anti-β-tubulin and anti-β-actin monoclonal antibodies for normalization.

4. Results

Microtubules are directed but maintained at distance of N-cadherin mediated cell-cell contacts

We investigated here the connection between cadherin adhesions and MTs during stable cell-cell contact formation. We observed that MTs were recruited and directed towards cell-cell contacts in C2C12 myogenic cells (**Figure 1A**), as reported in other cell types (Stehbens et al., 2006; Waterman-Storer et al., 2000). This observation was further supported by the analysis of MT distribution in C2C12 cells spread on fibronectin (FN) coated micropatterns. These micropatterns are designed to impose a specific shape on cell doublets in order to have a better control on the position, shape and orientation of cadherin-mediated cell-cell contacts as well as a spatial segregation with integrin-mediated cell-substratum contacts (**Figure 1B**). In these conditions, we confirmed that some MTs were oriented toward β-catenin-labeled cell-cell contacts. However, there was a strong bias of MT recruitment in cell doublets toward cell-substratum contacts opposite to the cell-cell contact area, suggesting that cadherin-mediated adhesion may have a negative effect on the recruitment of MTs. In order to further study the specific influence of cadherin-mediated adhesion on MTs recruitment, we analyzed the effect of N-cadherin engagement on MT distribution in cells spread on N-cadherin substrates mimicking cell-cell contacts. We showed previously that in these conditions cells form extensive cadherin adhesions in the marginal lamellipodial area mimicking actual cadherin-mediated cell-cell contacts (Gavard et al., 2004). We observed that some MTs were directed toward these adhesion sites revealed by anti-β-catenin staining **(Figure 1C)**. Immunostaing of MT +TIPs with EB proteins indicated that these MTs were oriented with their +end directed toward the cell periphery on both substrates **(Figure S1)**. However in striking opposition to what we observed in cells spread for the same period (2 hours) on FN, the MT network clearly failed to penetrate deeply within the N-cadherin specific adhesion area **(Figure 1C)**.

Thus, compared to FN mediated adhesion, N-cadherin engagement had a mixed influence on the penetration of MT in adhesion areas, maintaining MTs at distance from the cell edge. Quantification of the surface occupied by the MT network over the whole cell surface indicated that the invasion of the cytoplasm by MTs was lowered by around 20 % in cells spread on Ncad-Fc compared to cells spread on FN **(Figure 1D)**. Reporting the surface occupied by the MT networks to the adhesion areas revealed an even more striking difference between FN adhesions (67.1 ± 1.5% of the adhesion area occupied by MTs) and cadherin adhesions (30.4 ± 4.0% of the adhesion area occupied by MTs) **(Figure 1E)**, indicating a dramatic inhibition of MT penetration in cadherin adhesions compared to FN adhesions.

These differences may be due to a difference of maturation of MTs at these early stages after cell contact initiation (2 hours of spreading). Indeed, striking time-dependent changes of the MT content in glutamylated and tyrosinated tubulins contents were observed during the first hours of spreading of trypsined fibroblasts on FN substrates (Palazzo et al., 2004). To compare the biochemical nature of the MTs recruited at adhesion sites in cells spread either on FN or on Ncad-Fc, respectively, immunolabelling were performed with a pan-α-tubulin antibody, or antibodies recognizing specifically glutamylated, tyrosinated and acetylated forms of α-tubulin **(Figure S2)**. As expected for cells shortly after passaging and recovering from rounding up (Palazzo et al., 2004), the MT network was predominantly labeled with anti-tyrosinated tubulin antibodies and did not contain significant levels of glutamylated α-tubulin both on FN and Ncad-Fc substrate after 2 hours of spreading. However, cells spread on FN persistently showed the

presence of short MT segments in the perinuclear region that where immunoreactive for acetylated α-tubulin while no trace of labeling was detected in cells spread on Ncad-Fc, indicating that some more stable MTs had formed in this short period on FN, while this was not the case on Ncad-Fc. Altogether, these observations indicate that N-cadherin adhesions may be less favorable than FN adhesions or have an inhibitory effect on the stabilization of MTs and their penetration in adhesion sites.

Figure 1 | **MTs are directed toward cell-cell contacts in C2 cells but maintained at distance by cadherin engagement.**

(figure next page)

Myogenic C2 cells were grown overnight in standard conditions **(A)** or for two hours on fibronectin (Fn) coated micro patterns **(B)**, then fixed and immunostained for β-catenin and α-tubulin. MTs (green) were recruited both at naturally occurring β-catenin-labelled cell-cell contacts (red), **(A)** and at oriented contacts on patterned fibronectin substrates **(B)**. Notice however the weak recruitment of MTs at the cell-cell contact (enlarged box) contrasting with their enrichment at cell-matrix contacts at the opposite side of the cells. **(C):** Alternatively, C2 cells were plated for two hours on Ncad-Fc and Fn homogenous substrates, respectively. Only a few MTs penetrated cadherin adhesion areas of cells spread on Ncad-Fc while MTs tend to occupy the whole cytoplasm of cells spread on Fn, while. Bars: 10 µm. The histograms represent the ratios of the surface area occupied by MTs over the whole cell area for cells in **(D)**, and the ratio of the surface area occupied by MTs within adhesion areas over the adhesion surfaces area (**E**). Results are expressed as the mean ± SEM from three independent experiments with 10 cells analyzed per condition and per experiment. Statistical analysis: unpaired Student's t-test, p value: <0.0001 for E and D.

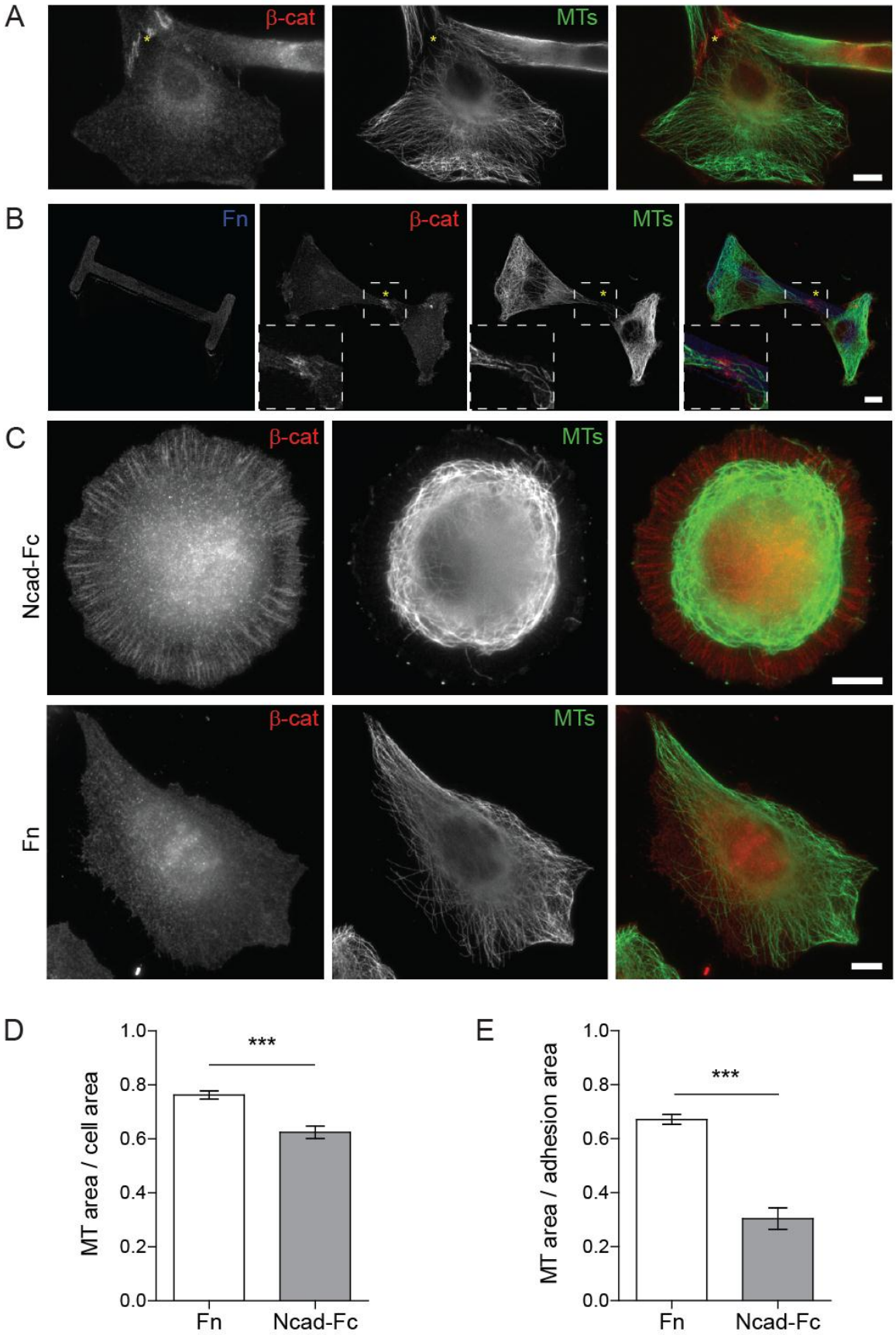


Figure 1 | **MTs are directed toward cell-cell contacts in C2 cells but maintained at distance by cadherin engagement.** (full legend on the previous page)

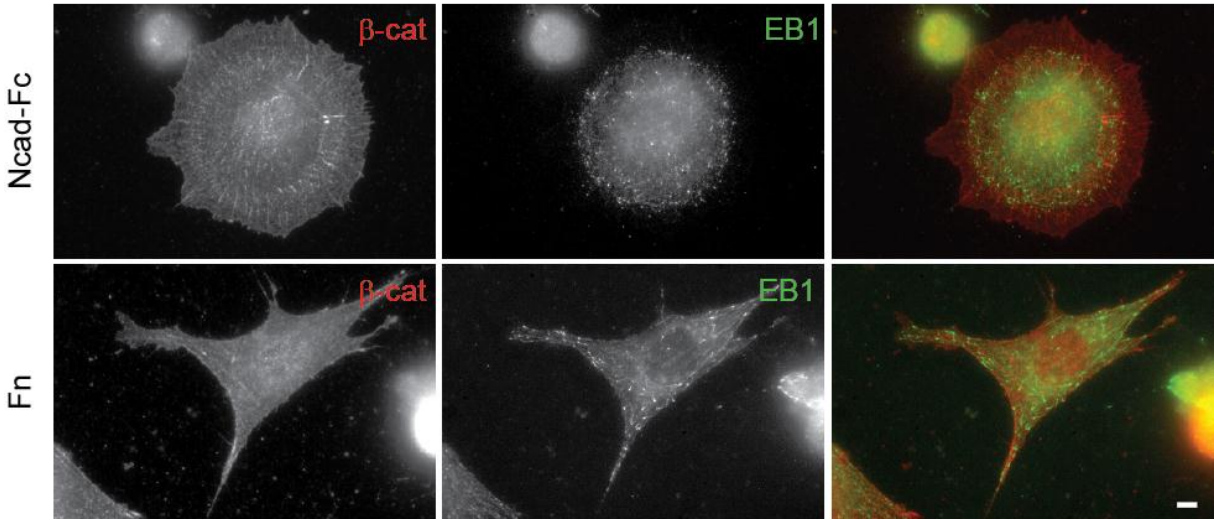


Figure S1 | Distribution of MT +TIPs in C2 cells spread on Ncad-Fc.
C2 cells plated either on Ncad-Fc or Fn substrates for 2 hours were stained with anti-β-catenin and anti-EB1 antibodies. Comet-like EB1 accumulations decorating growing MT +TIPs rarely populate the periphery of cells spread on Ncad-Fc corresponding to the cadherin adhesion areas, these comets were frequently oriented tangential to the cell edge (top). In contrast, these comets were detected over the whole cytoplasm of cells spread on Fn and directed perpendicular to the cell edge (bottom). Scale bars: 10 µm.

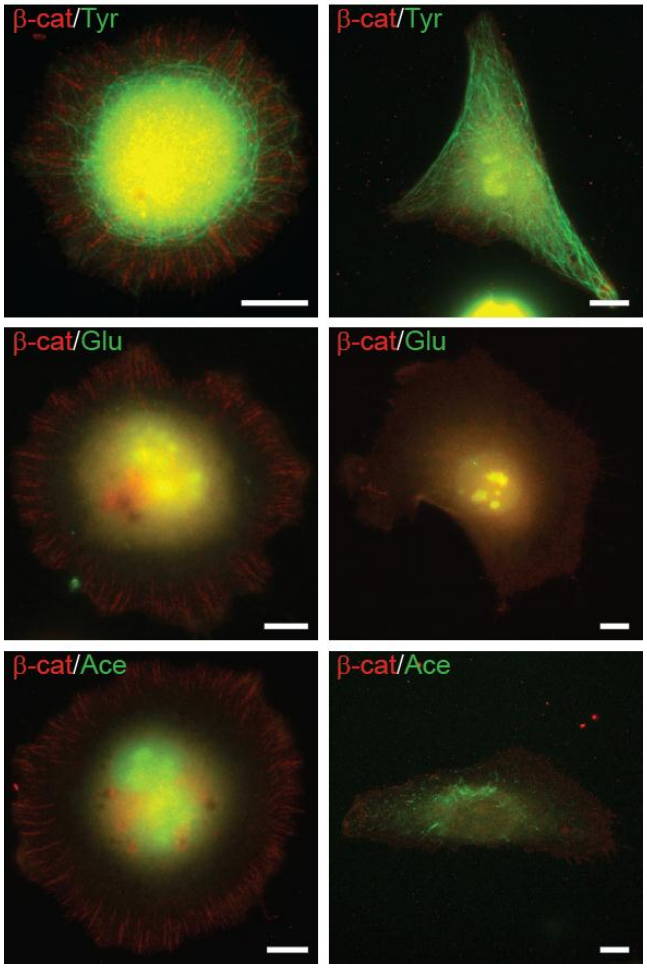


Figure S2 | Characterization of MTs in C2 cells spread on Ncad-Fc.
Immunostaining for specific post-translational modified forms of α-tubulin in cells plated on Ncad-Fc and Fn. Tyrosinated tubulin (Tyr) was the major form of tubulin found incorporated in MTs both on Ncad-Fc and Fn. Neo-formed glutamylated (Glu) MTs were completely absent from cells plated on both Ncad-Fc and Fn. Acetylated MTs were also absent from cells seeded on Ncad-Fc but detected in the perinuclear region of cells seeded on Fn. Scale bars: 10 µm.

EB comets persistence and MT mean elongation rate are negatively regulated by cadherin engagement

The reduced MT recruitment in adhesion areas may result from the mis-orientation of growing MT +TIPs or from an impaired MT dynamics. To test this latter hypothesis, we thought to evaluate the effect of N-cadherin engagement on MT dynamics in living C2 cells. Transfecting either α or β-tubulin tagged to GFP turned out to be un-adapted since most of the GFP signal in these conditions remained cytosolic and was not associated with MTs. Thus, in order to quantify differences in MT dynamics we visualized +TIP complexes in cells expressing either GFP-tagged EB1 or EB3 proteins. As reported previously in other cellular models (Stepanova et al., 2003), EB proteins concentrate in comet-like structures at the tip of MTs of cells plated on FN as well as on Ncad-Fc (Figure 2A, double labelling EB-tubulin not shown). However, EB proteins persistently accumulated in the cytosol of cells seeded on Ncad-Fc. The displacement of these +TIP proteins was oriented toward the cell periphery as expected but was obviously reduced in cells seeded on N-cadherin **(Figure 2A, B)**. In order to quantify this effect, the EB labeled comets were tracked and their mean displacement velocity calculated. Such quantification confirmed that the mean displacement of MT +TIPS on Ncad-Fc with a value of 1.13 ± 0.01 µm/s was significantly slower than on fibronectin (1.33 ± 0.02 µm/s) **(Figure 2C)**. In order to assess whether this reduction in forward displacement speed of MT +TIPs was due to an inhibitory effect of N-cadherin engagement or to the absence of a positive signal provided by adhesion of cells on fibronectin, we perturbed N-cadherin signalling by overexpressing a dominant negative form of N-cadherin (DN Ncad) deleted for cadherin ectodomain (Riehl et al., 1996). The expression of DN Ncad restored a speed of forward displacement of MT +TIPs comparable to the one observed in cells spread on fibronectin, indicating that the reduced comet displacement observed on N-cadherin resulted from an inhibitory effect of cadherin adhesion rather than the absence of a positive signal elicited by adhesion to fibronectin. Thus the prevention of MT penetration in adhesion areas induced by N-cadherin engagement was paralleled by a significant reduction of MT +ends forward movement, although no direct relation between two processes could be made at this stage.

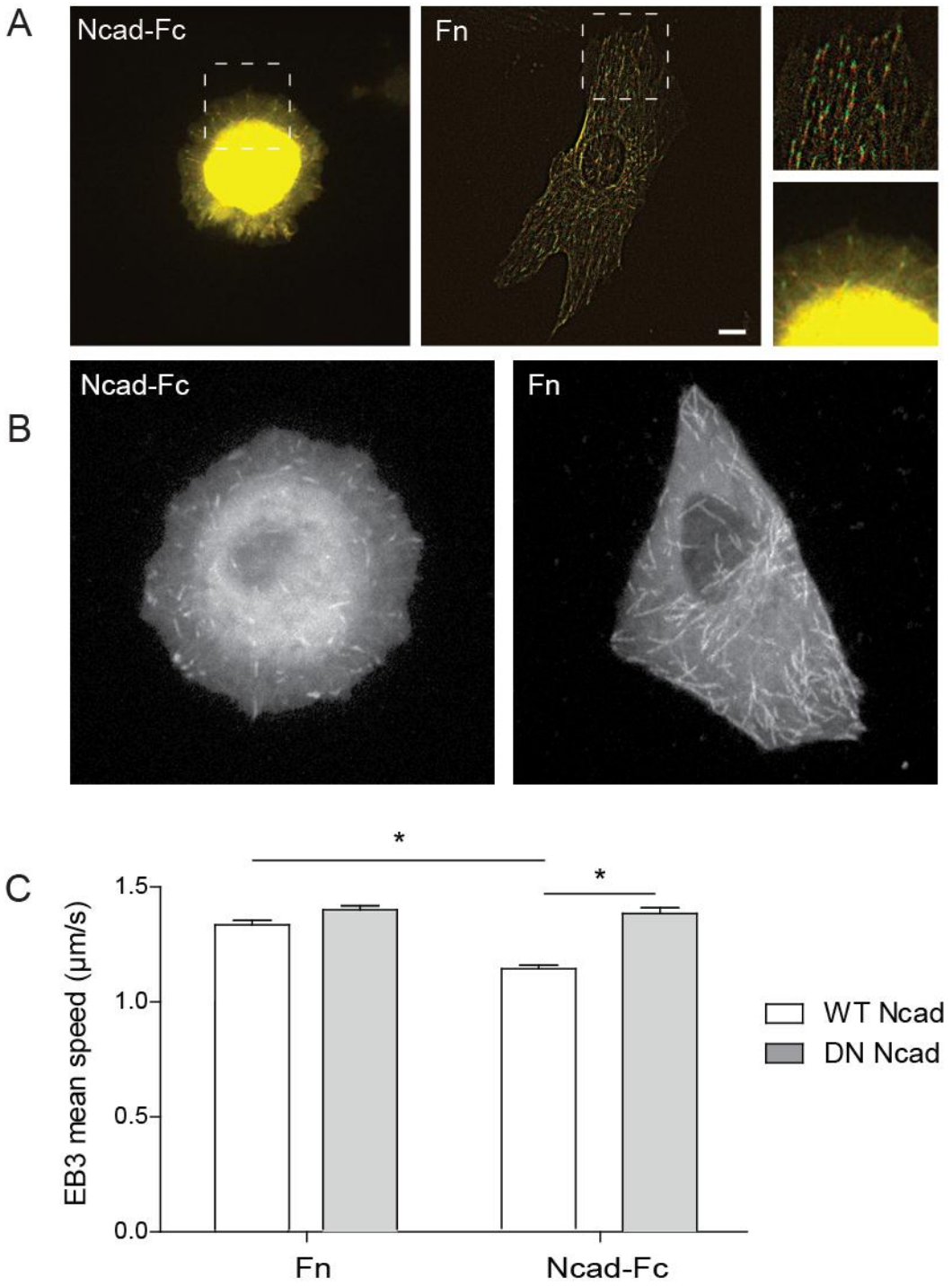


Figure 2 | EB3 comet persistence and MT mean elongation rate are negatively regulated by cadherin engagement.

Spinning disk live cell imaging was performed on EB3-GFP or EB3-mCherry expressing C2 cells plated for 2 hours on Ncad-Fc and Fn substrates. **(A)** Representative illustrations of EB3-GFP comet displacement were obtained by superposition of color-coded images. Three successive frames acquired at a frequency of 1 frame/s were encoded in red and combined with the three following frames encoded in green. Areas delimitated by white dotted lines is shown at higher magnification on the right side. **(B)** Representative illustrations of EB3 comet persistence and growth MT elongation were obtained by maximal projection of video frames (60 frames acquired over 15 secondes). Scale bars: 10 µm.

(C) Cells double transfected with EB3-GFP and WT Ncad or DN Ncad constructs fused to DsRed were plated on Fn and Ncad-Fc substrates for two hours and processed for spinning disk live cell imaging on the streaming mode at the frequency of 3.7 frames/s. Mean displacement speeds of MT +TIPs were determined following

manual tracking of EB3-GFP comets. MT +TIPs mean speed was significantly lower in cells seeded on Ncad-Fc than in cells spread on Fn. This negative effect of Ncad-Fc was alleviated by the expression of the DN Ncad mutant. Data were typically collected across 3 independent experiments, 20 comets tracked per cell, 5 cells considered per condition in each experiment. Results are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis with the non-parametric Mann-Whitney test: *** $p < 0.0001$.

Cytochalasin but not blebbistatin treatment alleviates the negative effect of N-cadherin engagement on MT +TIPs dynamics.

Alternatively we hypothesized that MT penetration may be counteracted by the actin networks structure or dynamics as suggested by the previously reported negative effect of acto-myosin contractile bundles on the penetration of MTs in neuronal growth cones (Burnette et al., 2007; Dent et al., 2007). In order to test for an involvement of actin filaments in the regulation of MTs, we first analyzed the effect of actin filament depolymerization by cytochalasin D on the mean velocity of MT +TIPs displacement in cells seeded on Ncad-Fc. We observed a significant shift of the distribution of EB3 comets velocities to higher values after treatment of cells with 100 nM cytochalasin D **(Figure 3A)**. The mean speed of MT +TIPS displacement shifted from of 1.07 ± 0.02 µm/s before treatment to 1.16 ± 0.05 µm/s after treatment, indicating that indeed the structure or dynamics of the actin network may be involved in the inhibitory effect of N-cadherin adhesion on MT dynamics. We then treated the cells with blebbistatin to inhibit Myosin II activity to impair actin dynamics independently of F-actin depolymerisation. This drug partially blocks actin filament dynamics and in particular actin treadmilling in the lamellipodium without inducing the rupture of the actin networks **(see Figure 4)**. Blebbistatin treatment at the opposite of cytochalasin D treatment induced a significant shift of the distribution of EB3 comets velocities to lower values **(Figure 3B)**, indicating a further reduction in the velocity of MT +ends. The mean speed of MT +TIPs displacement shifted from of 1.07 ± 0.02 µm/s before to 0.96 ± 0.02 µm/s after treatment with 20 µM blebbistatin. Altogether, these observations tightly link MT dynamics and penetration in cadherin adhesions to actin dynamics and myosin II activity.

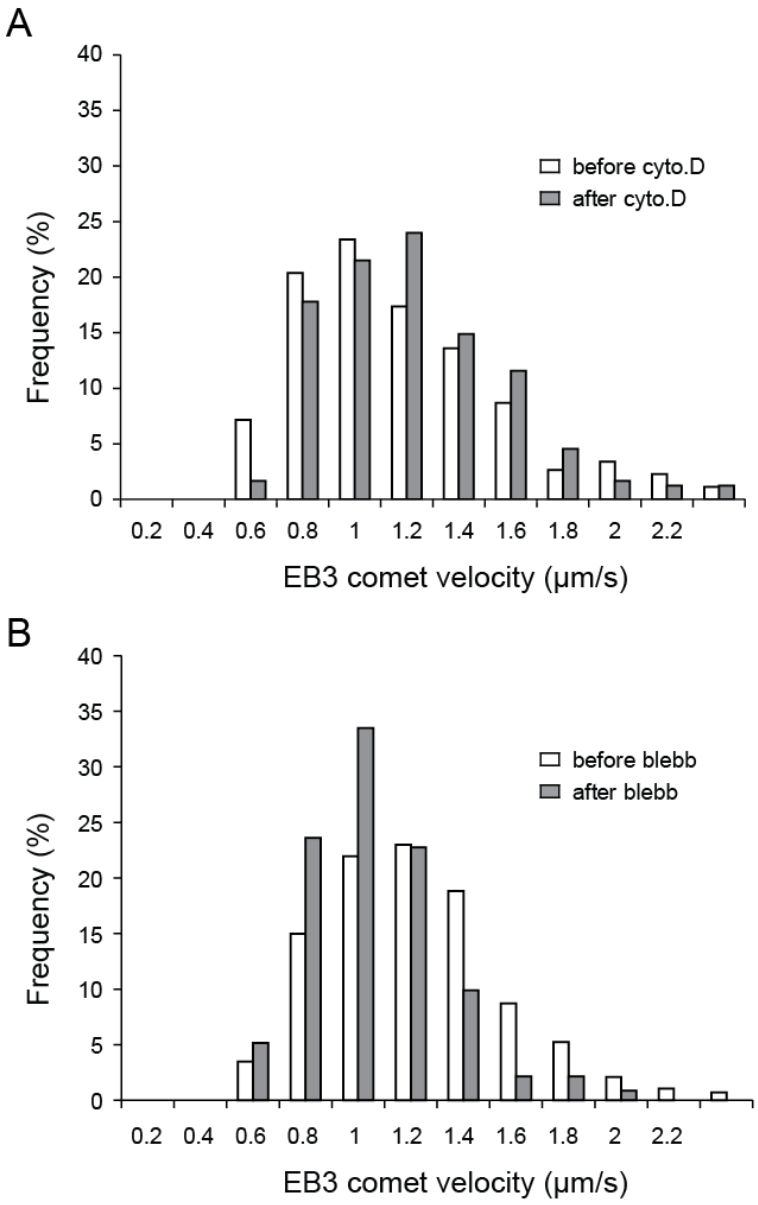


Figure 3 | **Cytochalasin but not blebbistatin treatment alleviates the negative effect of N-cadherin engagement on MT +ends dynamics.**

Ncad-DsRed and EB3-GFP double transfected cells were plated on Ncad-Fc for 2 hours, processed for 2 colors spinning disk live cell imaging before and after treatment with DMSO alone or with cytochalasin D 100 nM **(A)** or blebbistatin 20 µM **(B)**. Individual EB comets were tracked in three independent experiments (5 to 10 cells per condition and per experiment). Histogram presents compared mean comet displacement speed distribution before and after treatment. Statistical analysis with the non-parametric Mann-Whitney test: $p<0.05$ and $p< 0.0001$ for cytochalasin D effect and blebbistatin effect, respectively.

N-cadherin engagement stimulates the retrograde actin treadmilling.

We first hypothesized that MT penetration and/or dynamics may be counteracted by the actin tread milling moving in the opposite direction of MT growth at the cell periphery ((Ponti et al., 2004). If the hypothesis was true, it was expected to observe an inverse correlation between MT penetration in the lamellipodium (and/or +TIPs displacement) and the rearward actin movement in the vicinity of cadherin adhesions. To answer this question, actin dynamics was visualized thanks to the use of the Lifeact probe (Riedl et al., 2008) expressed in C2C12 cells seeded either on Fibronectin or Ncad-Fc **(Figure 4A)**. The speed of the velocity of the actin tread milling at the cell periphery was further quantified by kymograph analysis. Interestingly, we observed a two-fold stimulation of actin tread milling in cells spread on N-cadherin versus cells spread on fibronectin **(Figure 4B)**. Thus, the reduced +TIPs dynamics and decreased penetration of MTs in N-cadherin adhesion correlate with a strong increased in actin dynamics. As expected, blebbistatin treatment drastically reduced the speed of the rearward movement of actin filaments **(Figure 4C, D)** while it induces also a decrease in the EB3 comets mean velocity **(see Figure 3B)**. These results are in opposition to the hypothesis of a reduced MT+ end penetration merely slowed down by an opposite flow of actin filaments. Moreover, the expression of a DN form of N-cadherin which reverts the inhibitory effects of N-cadherin engagement on MT +TIPs dynamics had no obvious effect on the penetration of MT in cadherin adhesions (**Figure S3A, B)**, suggesting that MT +TIPs dynamics reduction may not be the major cause of the limited penetration of MT + ends in cadherin adhesion areas.

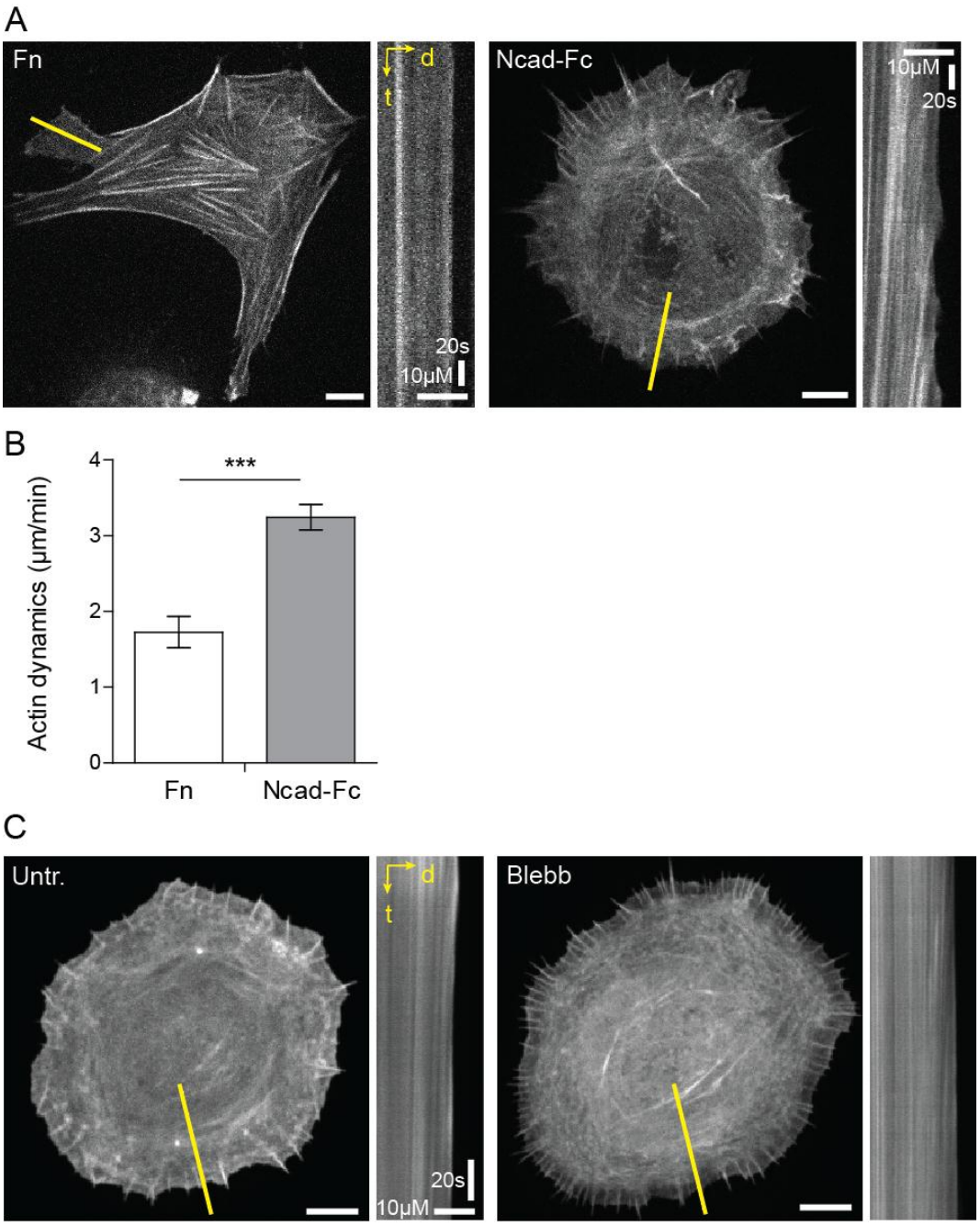
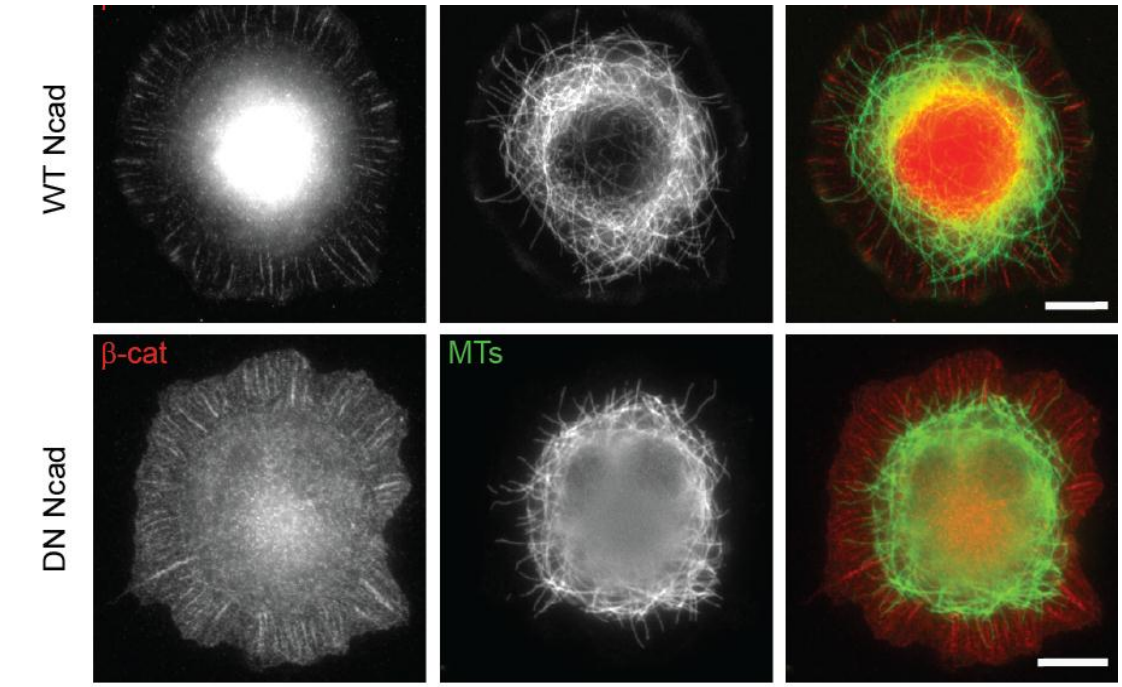


Figure 4 | N-cadherin engagement stimulates the actin retrograde flow.

(A) LifeAct-GFP, Ncad-DsRed expressing C2 cells plated for 2 hours on either Fn and Ncad-Fc were analyzed by spinning disk live cell imaging. Scale bars: 10 µm. **(B)** The actin retrograde flow was quantified by kymograph analysis of regions located over the adhesion area in the lamellipodium (yellow line, corresponding kymographs on the right of each picture). The actin retrograde flow at the periphery of cells seeded on N-cadherin was almost two times faster than the one observed in cells seeded Fn. Statistical analysis over three independent experiments: Student's t-test, *** p value: <0.0001. **(C)** Similar live cell imaging and **(B)** image analysis were performed in the absence (Untr.) and in the presence of blebbistatin 20µM (blebb). When myosin II was inhibited the retrograde flow of actin was slowed down by two fold. Statistical analysis over two independent experiments: Student's t-test, *** p value: <0.0001.



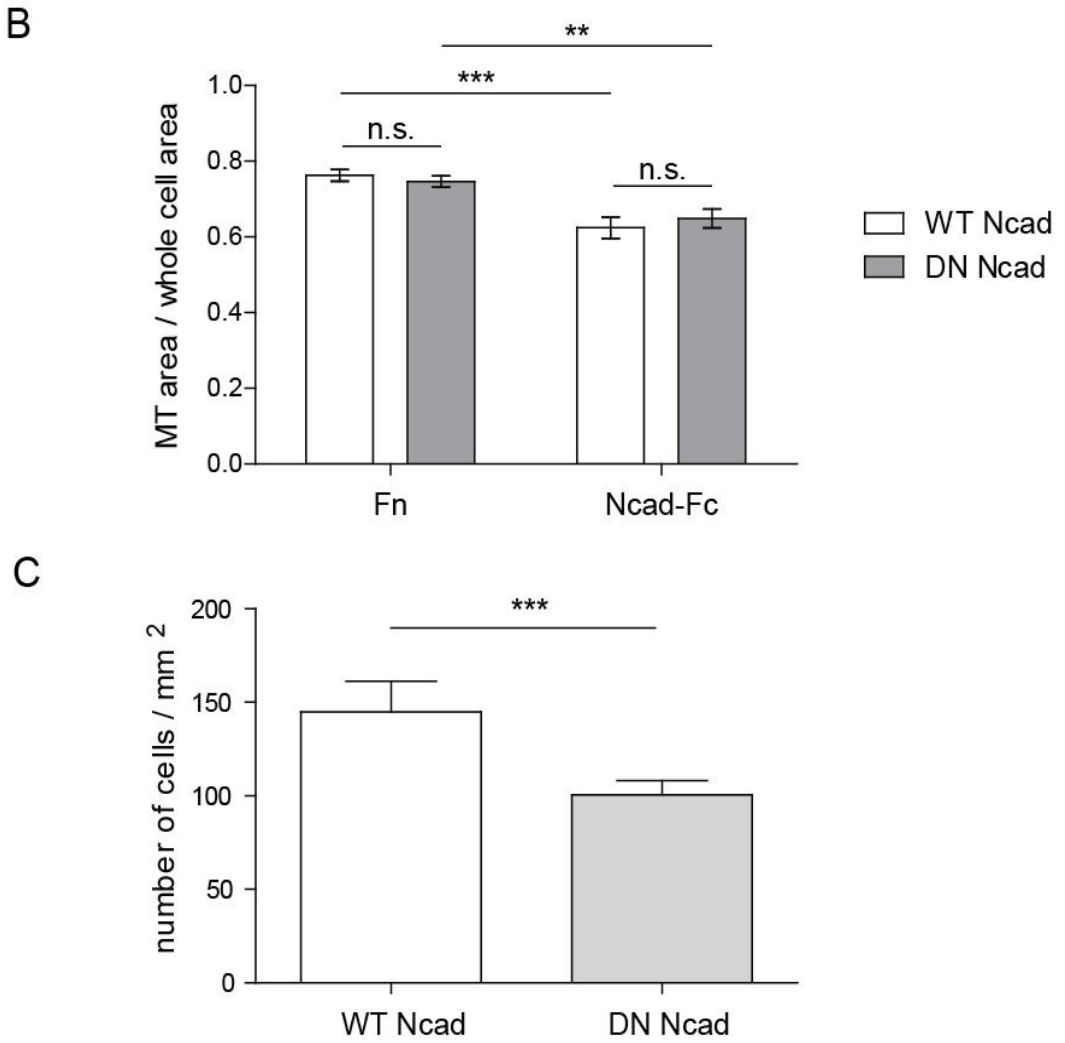


Figure S3 | **Effect of the expression of DN-Ncad mutant on MT penetration.** (full legend next page)

Figure S3 | **Effect of the expression of DN-Ncad mutant on MT penetration**. (figure on the previous page)
(A) C2 cells were transfected with either the WT Ncad or DN Ncad constructs then plated on Fn and Ncad-Fc and immunostained for β-catenin and α-tubulin. DN Ncad expressing cells were not grossly impaired for cadherin adhesion formation. Scale bars 10 µm. **(B)** the expression of DN Ncad did not affect MT network spreading either on Fn or or Ncad-Fc. Statistical analysis: One way ANOVA, ** p value <0.001; *** p value: <0.0001. **(C)** To verify the efficacy of the construct in blocking N-cadherin mediated adhesion, the number of WT Ncad or DN Ncad expressing C2 cells adhering to the Ncad-Fc substrate 2 hours after plating on Ncad-Fc was determined. DN Ncad expression significantly inhibits the ability of C2 cells to adhere to the Ncad-Fc substrate. Statistical analysis: paired t-test: *** p value <0.001.

The actin network is responsible for the inhibition of MT recruitment in cadherin adhesions

A more precise observation by confocal analysis of the distribution of MTs and cadherin-catenin complexes and actin filaments revealed that most of the MTs did not pass through the tangential acto-myosin arc present at the rear of the lamellipodium but in contrast were turning tangentially along these actin filaments **(Figure S4)**. Furthermore, the orientation of EB labeled MT +TIPs was consistent with these observations. Indeed, while the EB comets were distributed radially in the whole cytoplasm up to the cell margin in cells spread on FN, they were rarely detected in the cadherin adhesion areas and the more distally located comets were most of the time oriented tangentialy to lamellipodium edge **(Figure 2)**. These observations may suggest that this contractile acto-myosin arc formed at the rear of cadherin adhesions may relay most of the inhibition of MT penetration in cadherin adhesions. To test this hypothesis we first analyzed the effect of cytochalasins mediated destruction of the actin filament networks on the penetration of MTs in cadherin adhesions **(Figure 5)**. Mild actin filament perturbation with cytochalasin significantly increased the penetration of MTs in lamellipodium of cells seeded on N-cadherin substrates. We then treated the cells with cytochalasin D which is a much more potent inhibitor of actin polymerization and induces a drastic destruction of the actin networks **(Figure S5)**. Cytochalasin D triggered the full penetration of MTs in the lamellipodium of cells seeded on N-cadherin **(Figure 5)**, supporting the notion that the actin networks and in particular the tangential actin bundles at the rear of the lamellipodia have an obstructive effect of on MT penetration in cadherin adhesions. To further support this hypothesis, we used the Myosin II inhibitor blebbistatin to independently disrupt this structure. Blebbistatin indeed disrupted the contractile acto-myosin ring, although less efficiently than cytochalasin D **(Figure S5)**, and concomitantly increased significantly the penetration of MTs in the lamellipodium **(Figure 5**), indicating that the acto-myosin networks organized at the rear of cadherin adhesions indeed is the principal element preventing MTs recruitment in cadherin adhesions. Altogether, these results unravel an obstructive effect of the tangential actin bundle at the rear of the lamellipodia on MT penetration in cadherin adhesion independently of MT dynamics.

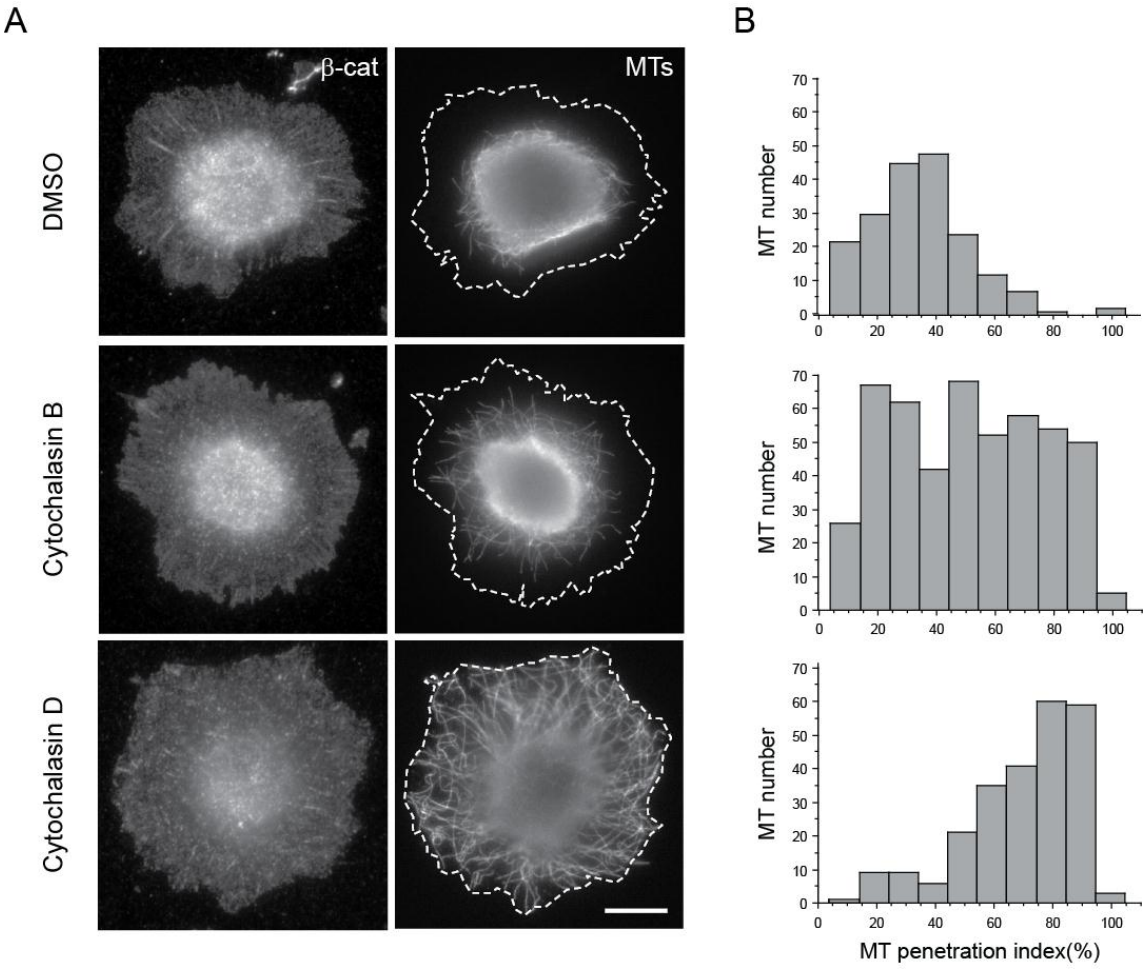


Figure 5 | An acto-myosin belt is responsible for the inhibition of MT recruitment in cadherin adhesions.

(A) C2 cells were plated on Ncad-Fc for 2 hours, then either treated with DMSO alone or with cytochalasin B 350 nM or cytochalasin D 100 nM during 20 minutes before fixation. Cells were then stained for β-catenin (left) and MTs (right). Scale bar: 10 µm. **(B)** Individual MT penetration was quantified as described in "Experimental Procedure" section and reported as a frequency of MTs as a function of penetration in the lamellipodium (distance of MT penetration in the lamellipodium/ lamellipodim full length). In control conditions (DMSO), MTs penetrating in the lamellipodium only display a weak penetration index. In contrast cytochalasin D treatment leads to a high number of MTs fully penetrating the adhesion area. cytochalasin B treatment had an intermediary effect. Statistical analysis with the non-parametric Mann-Whitney test: $p< 0.0001$ for both cytochalasin B and cytochalasin D treatment compared to DMSO treatment. **(C)** C2 cells were plated on Ncad-Fc for 2 hours, then either treated with DMSO alone, cytochalasin D 100 nM or blebbistation 20 µM during 20 minutes before fixation and evaluation of the MT network spreading as reported in Figure 1 legend. Results are expressed as the mean ± SEM from three independent experiments, $n \geq 16$ cells per condition. Statistical analysis: one way ANOVA test, ** p value <0.001; *** p value <0.0001.

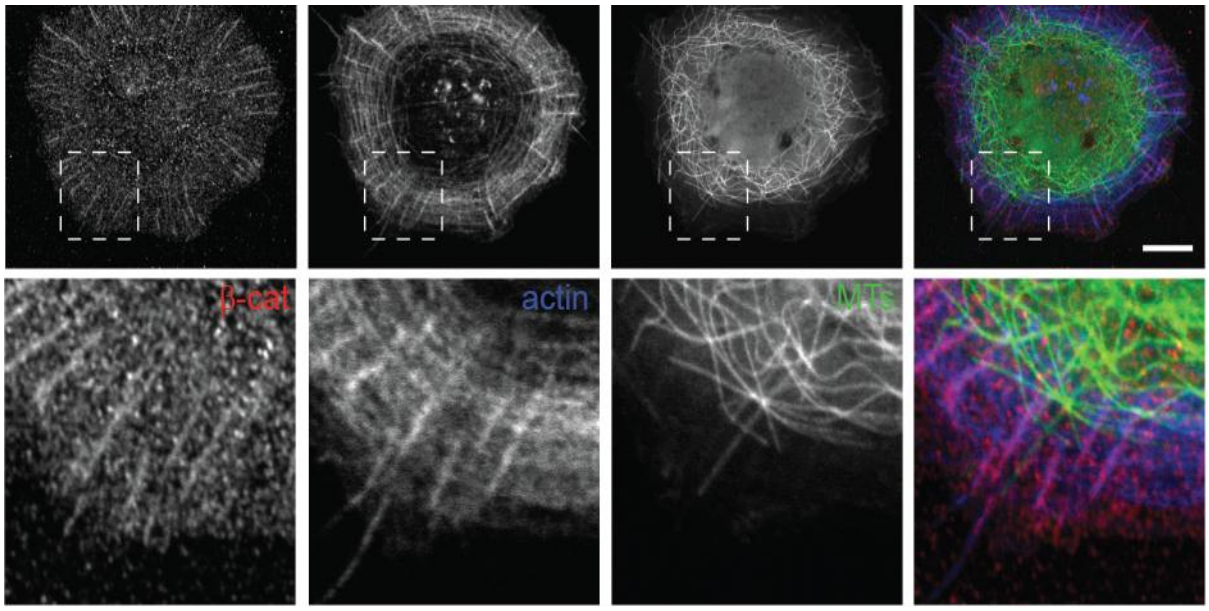


Figure S4 | Relative distribution of MTs, cadherin adhesions and actin.
C2 cells were plated on Ncad-Fc for 2 hours, fixed, immunostained and analyzed for the distribution of β-catenin (red), F-actin (blue) and MTs (green). The area delimited by white dotted square is shown at higher magnification (bottom). The few MTs that penetrate the cadherin adhesion area do not colocalize with actin-β-catenin double-labeled cadherin adhesions and only infrequently aligned parallel to these radial structures. Most of the MTs were oriented tangential to the circular actin filament bundle at the rear of the cadherin adhesion zone. Scale bar: 10 µm.

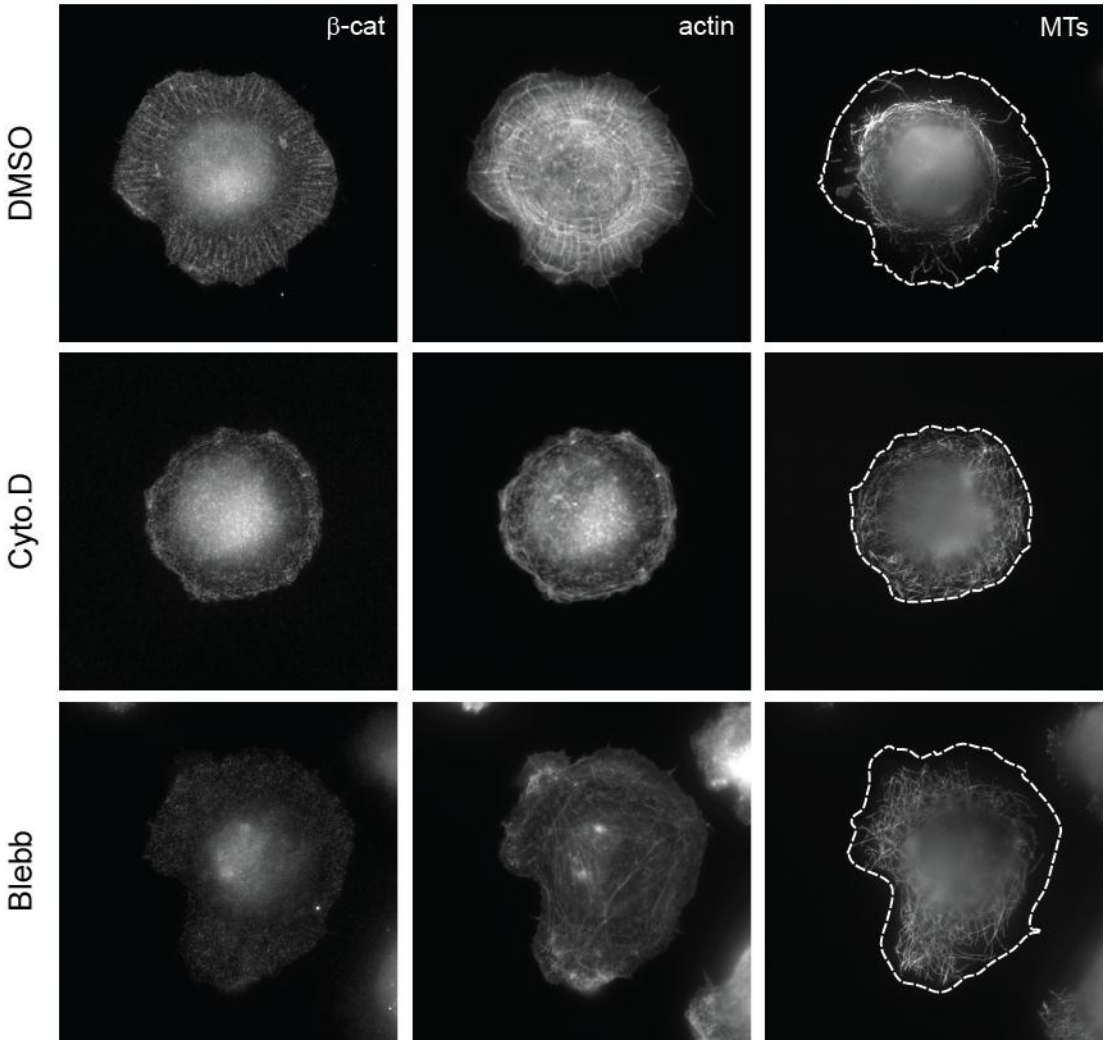


Figure S5 | Effect of Cytochalasin D and blebbistatin on F-actin and MT organization.
C2 cells on Ncad-Fc substrates were treated with DMSO, cytochalasin D 100nM or blebbistatin 20 µM during 20 minutes, fixed and stained for β-catenin (left) F-actin (middle) and MTs (right). CytochalasinD treatment induced a net disorganization of both actin networks and actin cytoskeleton concomitant with an extension of the MT networks toward the cell edges. The inhibition of myosin II activity by blebbistatin triggered similar although less drastic effects on actin and MT networks. Scale bar 10 µm.

Perturbation of MTs dynamics stabilizes N-cadherin adhesion.

We then asked whether this limited penetration and dynamics of MTs in adhesion areas may have an impact in return on N-cadherin mediated cell adhesion and cadherin adhesion formation. The pretreatment of cells with nocodazole (1 and 10 µM) or taxol 10 µM had no significant effect on the capacity of C2 cells to adhere on the Ncad-Fc substrate (data not shown). The treatment of cells after spreading on Ncad-Fc by nocodazole or taxol had no further destabilizing action on preformed cadherin adhesions **(Figure 6A)**, confirming that MTs are not required for the formation and maintenance of N-cadherin-mediated adhesion plaques (Gavard et al., 2004). In contrast, quantification of the mean gray intensity β-catenin immunofluorescent staining of individual cadherin adhesions revealed that they were significantly denser after taxol treatment suggesting that they contain significantly more cadherin-catenin complexes **(Figure 6B)**. Interestingly this positive effect on the recruitment of cadherins in cadherin adhesion was paralleled by a reduction of the penetration of taxol stabilized MTs in the peripheral adhesion rich area of cell as measured by the spreading of MTs in the cytoplasm of taxol-treated cells **(Figure 6C)**.

Figure 6

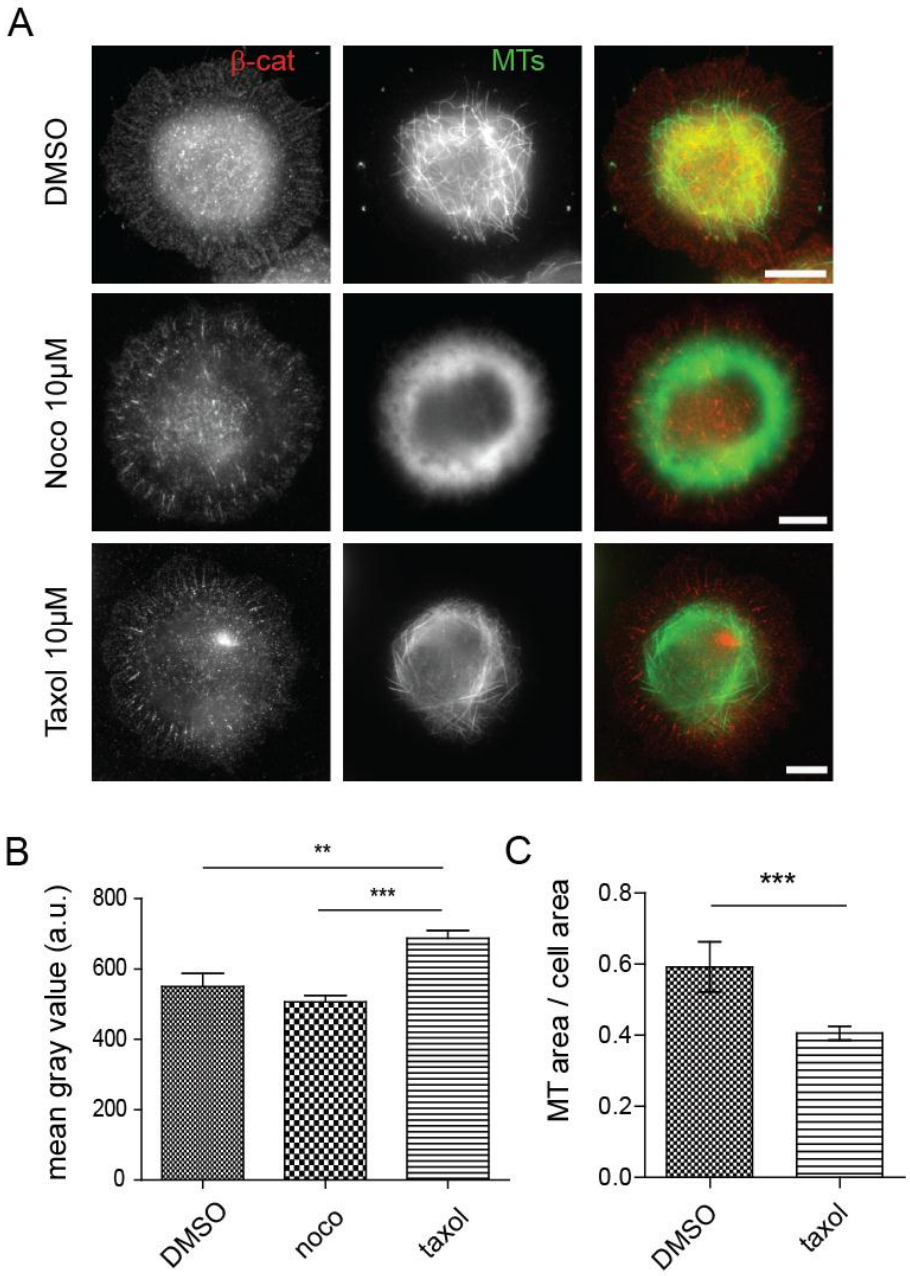


Figure 6 | Taxol treatment stabilizes N-cadherin adhesions.
(A) C2 cells on Ncad-Fc substrates were treated during 20 minutes either with 10µM nocodazole, 10µM taxol or with DMSO alone. Preparations were then immunostained for β-catenin and α-tubulin to evaluate cadherin adhesions and MTs distribution, respectively. Notice the bundled aspect of MTs in cells treated with taxol and the presence of cadherin adhesion in all conditions. Scale bars 10 µm. **(B)** Quantification of the normalized β-catenin staining in radial accumulation of C2 cells on Ncad-Fc substrates treated during 20 minutes either with 10µM nocodazole, 10µM taxol or with DMSO alone. Taxol induced a significant increase in the β-catenin immunostaining. Results are expressed as the mean gray value ± SEM from four independent experiments, n ≥ 16 cells, per condition. Statistical analysis: one way ANOVA test, ** p value <0.001; *** p value: <0.0001. **(C)** The spreading of the MT networks in the cytoplasm of cells treated with taxol or DMSO alone was quantified as in Figure 1.

5. Discussion

Although a complex relationship between E-cadherin-mediated intercellular junctions and MT organization in epithelial cell is reported in the literature, nothing is known for other type of cadherins. Accordingly, we analyzed here the influence of N-cadherin engagement on MT recruitment and dynamics in myogenic cells. Unexpectedly, we found that: 1) although MTs are directed toward adhesion sites by their +end, N-cadherin-mediated adhesions had a clear repulsive effect on MTs in comparison to integrin-mediated cell matrix adhesions; 2) both the persistence time of +TIP protein EB3 comets and the mean speed of MT forward progression were reduced by N-cadherin engagement and this effect was associated with an opposite effect of N-cadherin engagement on the speed of the actin retrograde flow; 3) however, the prominent factor limiting the penetration of MTs in the adhesion area was the formation of a strong tangential bundle of acto-myosin filaments at the rear of the adhesion likely forming a physical barrier for MT +TIPs; 4) the negative regulation of MTs penetration and dynamics at nascent contact may be necessary for the strengthening of N-cadherin-mediated adhesion.

So far, only attraction and targeting of centrosomal microtubules +ends to E-cadherin-mediated adherens junctions have been reported in epithelial cells in relation with a positive feedback on junction stability (Shaw et al., 2007; Stehbens et al., 2006). Thus, the rather opposite picture observed here may be due to the differences between cadherin members although N-cadherin is also able to mediate the formation of adherens type junctions in some cell types (Radice et al., 1997) and previous reports link MTs and MT-associated motors to N-cadherin trafficking (Mary et al., 2002; Teng et al., 2005). Conversely, these differences could be associated to the well-known differences in cell-cell contact morphology, dynamics and stability observed between epithelial cells and myogenic cells, presenting a more fibroblastic phenotype in term of cytoskeleton and adhesion sites organization (Mege et al., 2006). Alternatively, we focus most here on the differential effects of N-cadherin-mediated adhesion versus integrin mediated adhesion using an approach that allows segregating the activation of the two types of adhesion receptors. This allows us to reveal pathways that are masked when both types of junctions are mixed in the culture system (Gavard et al., 2004). Accordingly, our data could be interpreted as a preferential recruitment and increased elongation speed of MTs at cell-ECM contacts versus cell-cell contacts. In this way they recall the observations of (Dupin et al., 2009; Jaulin and Kreitzer, 2010; Kadir et al., 2011) reporting a clear bias of the MT penetration and dynamics toward the free edge of cells at the border of cell islands in relation with the establishment of the front-rear cell polarity required for migration and the contact inhibition of locomotion. Importantly, although N-cadherin stimulates C2C12 lamellipodial activity and the actin-treadmilling speed compared to fibronectin, these cells are fully immobile on N-cadherin while they migrate on fibronectin (Lambert et al., 2007). Our observations are thus consistent with a major role of integrin/N-cadherin effects in biasing MT distribution and dynamics during cell polarization and migration. Along this line, our data support the hypothesis that the deficit in MT dynamics and recruitment at N-cadherin-mediated contacts results from an inhibitory action of N-cadherin engagement rather that from the absence of a positive signal provided by integrin. Indeed, the reduction of MT elongation mean velocity can be alleviated by the expression of a dominant negative (DN) form of N-cadherin. Although this DN form of N-cadherin had no significant effect on MT penetration, this could be explained by the fact that the mutant does not impair cadherin adhesion formation as well as the organization of the actomyosin arc at the rear of the adhesion zone which constituting the major barrier for MT

penetration. Indeed, we observe that although this mutant reduced the surface of spreading of cells on N-cadherin substrates, it did not alter the actin treadmilling speed (data not shown). These observations suggest that the effects of N-cadherin on MT penetration and +TIPs dynamics may be rather independent and/or are not mediated at the same threshold of N-cadherin engagement.

One of our major finding is that N-cadherin engagement had a strong and opposite effect on MT forward elongation and actin treadmilling rearward movement. The effect of N-cadherin on actin dynamics that has never been reported before could be of major importance for the formation of the tangential acto-myosin belt at the rear of the adhesion zone responsible for MT exclusion from the adhesion zone. Indeed Bershadsky and collaborators nicely reported on a clear dynamic relation between the two actin features during cell spreading on fibronectin before the step of cell polarization (Prager-Khoutorsky et al., 2011). It is tempting to postulate that the stimulation of the actin treadmilling is associated to the sequestration of α-catenin by engaged cadherin at nascent contacts, alleviating the inhibitory effect of the free pool of α-catenin on Arp2/3 actin polymerization (Benjamin et al., 2010), a major causal process of actin treadmilling. Interestingly, the DN form of N-cadherin used here (Ncad-Δextra), that may still recruit α-catenin at the membrane, had no significant effect on actin dynamics. Altogether, these results link functionally the engagement of N-cadherin, the stimulation of actin dynamics at nascent cell-cell contacts to the decrease in MT +end elongation. This later process reported earlier (Waterman-Storer et al., 2000) is accompanied by an overall depletion of MT +ends in proteins such as EB1, EB3 and CLIP-170, known to associate to stable growing + ends, and their apparent increased level in the cytoplasm (Figure 2), indicating that N-cadherin engagement could favor the dissociation of this +TIP proteins from the MT +ends. This process may be mediated by signaling proteins such Rho family GTPases known to be activated by cadherin engagement and to modulate MT dynamics (Braga, 2002) (Fukata et al., 2003; Stehbens et al., 2009). Alternatively, it has been reported, and we observed (data not shown) biochemical interactions between +TIP proteins and cadherin-catenin complexes, in particular co-immunoprecipitation of EB1 and EB3 with N-cadherin complexes in myogenic cells (Straube and Merdes, 2007; Zhang et al., 2009). These findings do not prove that +TIP complexes interact directly with cadherin-catenins complexes and at the opposite would be compatible with a binding of EB proteins dissociated from MT +ends with proteins of the cadherin complex present in the cytosol or at the membrane that may have a destabilizing effect on MT +ends.

However, the major obstacle to MT penetration in cadherin adhesions was not the reduction in +end stability and polymerization but appeared to be the physical barrier formed by tangential actin cables at the rear of the adhesion area. This is reminiscent of the failure of MTs to penetrate the tip of the growth cone when the formation of straight radial bundles of filopodial actin is prevented by mild cytochalasin treatment or Ena/VASP family protein depletion (Burnette et al., 2007; Dent et al., 2007). Accordingly, we never observed the formation of filopodia in C2C12 cells spread on N-cadherin substrates, nor we detected accumulation of mDia in this system. Moreover, the disruption of the tangential arc of actin either by cytochalasin or blebbistatin treatments allowed the full penetration of MT +ends in the adhesion zone independently of the effect of these drugs on MT dynamics. As these cells on Ncad-Fc, in contrast to what happened when they are on fibronectin, do not further polarize and break this acto-myosin belt, a process required for polarization, this may explain why MTs do not invade the N-cadherin adhesion while they invade adhesion areas on fibronectin. Although such actomyosin belt is not evident to capture at actual cell-cell contacts in myogenic cells a similar structure is clearly seen in epithelial cells during cell-cell contact maturation (Adams et

al., 1996; Ivanov et al., 2006; Ivanov et al., 2004). Further studies will allow determining whether the mechanisms described here for N-cadherin-mediated contact formation in myogenic cells could be generalized to E-cadherin-mediated adherens junction formation in epithelial cells.

In return we observed an effect of the alteration of MT dynamics on cadherin adhesion formation and cadherin-catenin complex stability. In contrast, the depolymerization of MTs during or after cell plating did not change the capacity of the cells to form and maintain their adhesion, neither the overall cadherin levels. These results confirm that MTs were not necessary for the cadherin adhesion formation process once the N-cadherin molecules have reached the plasma membrane (Gavard et al., 2004). These conclusions are in apparent opposition to what has been reported by others suggesting that MT integrity was important for the establishment and maintenance of cell adhesion mediated by cadherins (Yap et al., 1995b). Other studies report that MT destruction leads to contact disassembly or counteracts the reconstruction of intercellular contacts after a calcium switch (Ligon and Holzbaur, 2007; Stehbens et al., 2006; Waterman-Storer et al., 2000). However other studies report that MTs could act as negative regulators of cadherin contacts in specific conditions. Indeed, MTs depolymerization was reported to abolish the disassembly of intercellular contacts upon calcium removal resulting from the internalization of the cadherins (Ivanov et al., 2006; Kee and Steinert, 2001; Lorenowicz et al., 2007). Clearly further studies out of the scope of this study will be required to understand the impact of MT dynamics and presence at the vicinity of cell-cell contacts on cadherin-mediated adhesion formation and strengthening. However our results suggest that in myogenic cells at least, the negative regulation of MT penetration and dynamics at nascent N-cadherin-mediated contacts may be necessary for the maturation and strengthening of intercellular adhesion.

Altogether, these results clearly establish cadherins, actin filaments and the MT network as inter-regulated partners playing and essential role both in cell-cell contact stability and cell shape and polarity establishment. At the center of this regulation loop we demonstrated that N-cadherin adhesion finely regulates the recruitment of MTs through the stimulation of the acto-myosin system, in order to promote adhesion.

6. Acknowledgement

This work was supported by INSERM as well as grants from Association Française de Recherche sur le Cancer (ARC), Association Française contre les Myopathies (AFM) and ANR (Blanc program, grant number ANR-10-02, MECANOCAD). CP has been supported a Ministère de la Recherche PhD fellowship then by an ARC fellowship. Still and live cell imaging was performed in the Institut du Fer à Moulin Cell Imaging Facility. We would like to thank T. Irinoipoulou for her help in Image treatment and statistics as well as B. Ladoux and R. Seddiki for helping with micropattern fabrication.

7. References

Adams, C. L., W. J. Nelson, et al. (1996). "Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion." J Cell Biol **135**(6 Pt 2): 1899-1911.

Bacallao, R., C. Antony, et al. (1989). "The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium." J Cell Biol **109**(6 Pt 1): 2817-2832.

Bard, L., C. Boscher, et al. (2008). "A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration." J Neurosci **28**(23): 5879-5890.

Benjamin, J. M., A. V. Kwiatkowski, et al. (2010). "AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion." J Cell Biol **189**(2): 339-352.

Berx, G. and F. van Roy (2009). "Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(6): a003129.

Boscher, C. and R. M. Mege (2008). "Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling." Cell Signal **20**(6): 1061-1072.

Braga, V. M. (2002). "Cell-cell adhesion and signalling." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 546-556.

Burnette, D. T., A. W. Schaefer, et al. (2007). "Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of Aplysia neuronal growth cones." Nat Cell Biol **9**(12): 1360-1369.

Chausovsky, A., A. D. Bershadsky, et al. (2000). "Cadherin-mediated regulation of microtubule dynamics." Nat Cell Biol **2**(11): 797-804.

Chen, X., S. Kojima, et al. (2003). "p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions." J Cell Biol **163**(3): 547-557.

Cowin, P., T. M. Rowlands, et al. (2005). "Cadherins and catenins in breast cancer." Curr Opin Cell Biol **17**(5): 499-508.

Dent, E. W., A. V. Kwiatkowski, et al. (2007). "Filopodia are required for cortical neurite initiation." Nat Cell Biol **9**(12): 1347-1359.

Dupin, I., E. Camand, et al. (2009). "Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity." J Cell Biol **185**(5): 779-786.

Franco, S. J., I. Martinez-Garay, et al. (2011). "Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex." Neuron **69**(3): 482-497.

Fukata, M., M. Nakagawa, et al. (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-597.

Fukata, M., T. Watanabe, et al. (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." Cell **109**(7): 873-885.

Gavard, J., M. Lambert, et al. (2004). "Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways." J Cell Sci **117**(Pt 2): 257-270.

Giannone, G., R. M. Mege, et al. (2009). "Multi-level molecular clutches in motile cell processes." Trends Cell Biol **19**(9): 475-486.

Gumbiner, B., B. Stevenson, et al. (1988). "The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex." J Cell Biol **107**(4): 1575-1587.

Harris, T. J. and U. Tepass (2010). "Adherens junctions: from molecules to morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 502-514.

Hazan, R. B., R. Qiao, et al. (2004). "Cadherin switch in tumor progression." Ann N Y Acad Sci **1014**: 155-163.

Ivanov, A. I., I. C. McCall, et al. (2006). "Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions." BMC Cell Biol **7**: 12.

Ivanov, A. I., I. C. McCall, et al. (2004). "Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex." Mol Biol Cell **15**(6): 2639-2651.

Jamal, B. T., M. Nita-Lazar, et al. (2009). "N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct beta-catenin- and gamma-catenin-containing AJs." Cell Health Cytoskelet **2009**(1): 67-80.

Jaulin, F. and G. Kreitzer (2010). "KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC." J Cell Biol **190**(3): 443-460.

Jossin, Y. and J. A. Cooper (2011). "Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex." Nat Neurosci **14**(6): 697-703.

Kadir, S., J. W. Astin, et al. (2011). "Microtubule remodelling is required for the front-rear polarity switch during contact inhibition of locomotion." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2642-2653.

Kadowaki, M., S. Nakamura, et al. (2007). "N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain." Dev Biol **304**(1): 22-33.

Kawauchi, T., K. Sekine, et al. (2010). "Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking." Neuron **67**(4): 588-602.

Kee, S. H. and P. M. Steinert (2001). "Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin." Mol Biol Cell **12**(7): 1983-1993.

Lambert, M., F. Padilla, et al. (2000). "Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals." J Cell Sci **113 (Pt 12)**: 2207-2219.

Lambert, M., O. Thoumine, et al. (2007). "Nucleation and growth of cadherin adhesions." Exp Cell Res **313**(19): 4025-4040.

Lelièvre, E., E. Wolff, et al. (2010). "N-cadherin prevents neural cells to undergo apoptosis through Bim down-regulation." Submitted.

Ligon, L. A. and E. L. Holzbaur (2007). "Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly." Traffic **8**(7): 808-819.

Ligon, L. A., S. Karki, et al. (2001). "Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions." Nat Cell Biol **3**(10): 913-917.

Lorenowicz, M. J., M. Fernandez-Borja, et al. (2007). "Microtubule dynamics and Rac-1 signaling independently regulate barrier function in lung epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(5): L1321-1331.

Mary, S., S. Charrasse, et al. (2002). "Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism." Mol Biol Cell **13**(1): 285-301.

Mege, R. M., J. Gavard, et al. (2006). "Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 541-548.

Mege, R. M., F. Matsuzaki, et al. (1988). "Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7274-7278.

Meijering, E., O. Dzyubachyk, et al. (2012). "Methods for cell and particle tracking." Methods Enzymol **504**: 183-200.

Meng, W., Y. Mushika, et al. (2008). "Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts." Cell **135**(5): 948-959.

Niessen, C. M., D. Leckband, et al. (2011). "Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation." Physiol Rev **91**(2): 691-731.

Palazzo, A. F., C. H. Eng, et al. (2004). "Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling." Science **303**(5659): 836-839.

Ponti, A., M. Machacek, et al. (2004). "Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells." Science **305**(5691): 1782-1786.

Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, et al. (2011). "Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing." Nat Cell Biol **13**(12): 1457-1465.

Radice, G. L., H. Rayburn, et al. (1997). "Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin." Dev Biol **181**(1): 64-78.

Riedl, J., A. H. Crevenna, et al. (2008). "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin." Nat Methods **5**(7): 605-607.

Riehl, R., K. Johnson, et al. (1996). "Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo." Neuron **17**(5): 837-848.

Shaw, R. M., A. J. Fay, et al. (2007). "Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions." Cell **128**(3): 547-560.

Shtutman, M., A. Chausovsky, et al. (2008). "Signaling function of alpha-catenin in microtubule regulation." Cell Cycle **7**(15): 2377-2383.

Stehbens, S. J., A. Akhmanova, et al. (2009). "Microtubules and cadherins: a neglected partnership." Front Biosci **14**: 3159-3167.

Stehbens, S. J., A. D. Paterson, et al. (2006). "Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1801-1811.

Stepanova, T., J. Slemmer, et al. (2003). "Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein)." J Neurosci **23**(7): 2655-2664.

Straube, A. and A. Merdes (2007). "EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion." Curr Biol **17**(15): 1318-1325.

Teng, J., T. Rai, et al. (2005). "The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium." Nat Cell Biol **7**(5): 474-482.

Uchida, N., Y. Honjo, et al. (1996). "The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones." J Cell Biol **135**(3): 767-779.

Watanabe, T., J. Noritake, et al. (2009). "Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules." J Cell Sci **122**(Pt 16): 2969-2979.

Waterman-Storer, C. M., W. C. Salmon, et al. (2000). "Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells." Mol Biol Cell **11**(7): 2471-2483.

Yaffe, D. and O. Saxel (1977). "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle." Nature **270**(5639): 725-727.

Yap, A. S., B. R. Stevenson, et al. (1995). "Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation." Endocrinology **136**(10): 4672-4680.

Zhang, T., K. J. Zaal, et al. (2009). "Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion." J Cell Sci **122**(Pt 9): 1401-1409.

Deuxième partie

Influence de la N-cadhérine sur les microtubules au cours de la croissance neuritique.

2ème partie: Influence de la N-cadhérine sur les microtubules au cours de la croissance neuritique

La croissance neuritique est un mécanisme au cours duquel l'association de la N-cadhérine au cytosquelette d'actine est très importante et permet de stimuler la motilité du cône de croissance (Bard et al., 2008; Boscher and Mege, 2008; Thoumine et al., 2006). Cependant la morphogenèse neuronale, comme nous avons pu le voir dans la partie introductive (I. Introduction, Ch.III 5), est un processus nécessitant la coopération du cytosquelette d'actine et de microtubules. Par ailleurs nos travaux effectués dans la lignée myogénique de cellules C2C12 (1ère partie des résultats) démontrent que les adhésions dépendantes de la N-cadhérine inhibent le recrutement et la dynamique des microtubules dans les zones de contact. De plus nous avons pu mettre en évidence que cette régulation était dépendante du cytosquelette d'actine. Nous nous sommes donc demandé quelle était l'influence de la N-cadhérine sur les microtubules au cours de la croissance neuritique. Afin d'étudier l'impact de l'engagement de la N-cadhérine sur les microtubules, nous avons utilisé des neurones d'hippocampes d'embryons de rat étalés sur des susbtrats de N-cadhérine (substrat Ncad-Fc) et nous avons évalué dans un premier temps le comportement des neurones après l'engagement spécifique de la N-cadhérine. Dans un deuxième temps nous avons étudié l'impact de l'adhésion dépendante de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules et avons commencé à aborder l'étude du couplage des cadhérines à l'actine dans la régulation des microtubules. Enfin, en raison des résultats obtenus dans ces deux parties de l'étude, nous nous sommes également intéressés au rôle que la N-cadhérine pourrait jouer dans les processus de neuritogenèse.

1. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Des hippocampes d'embryons de rat provenant de femelles gestantes Sprague Dawley (laboratoires R. Janvier) ont été isolés dans du milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich) - 20mM d'Hepes et digérés avec de la trypsine 2,5% (Gibco) pendant 10 minutes à 37°C, puis dissociés mécaniquement. Ensuite les cellules ont été reprises dans du milieu MEM (Minimum Essential Media, Gibco) supplémenté avec de la glutamine 2 mM, du pyruvate de sodium 1 mM et étalées sur des lamelles recouvertes de substrats à 2.10^4 cellules/cm^2 pendant le temps indiqué à 37°C et 5% de CO_2. Toutes les expériences avec les animaux ont été conduites selon les directives du Ministère de l'Agriculture et des Forêts pour la manipulation des animaux (décret 87849, licence 75–765-Renouvellement) et approuvées par le Comité d'Ethique Charles Darwin sur l'expérimentation animale de Paris (numéro de permis Ce5/2010/064).

Production et purification de la N-cadhérine recombinante Ncad-Fc

La production et la purification de la protéine Ncad-Fc sont issues de l'adaptation de la méthode de Mireille Lambert (Lambert et al., 2000) par Laurence Duchesne. Les cellules HEK-293 ont été électroporées avec le plasmide pCEP4/Ncad-Fc et le milieu de culture (DMEM avec 250µg/ml de BSA) a été récolté tous les deux jours. Ce milieu contenant la protéine recombinante a été purifiée sur colonne de billes de sépharose couplées à la protéine G (Fast flow GE Healthcare). La pureté de la Ncad-Fc ainsi que sa concentration ont été évaluées par gel de bleu de Coomassie, en utilisant comme standard des fragments Fc purifiés.

Substrats

Les substrats ont été préparés sur des lamelles de verre nettoyées à l'acide nitrique et autoclavées. Ensuite toutes les lamelles ont été incubées en présence de poly-DL-ornithine (PO) (Sigma-Aldrich) à une concentration de 100µg/ml pendant 1h à 37°C puis lavées plusieurs fois avec du PBS 1X. Les lamelles destinées à recevoir uniquement de la PO ont été gardées avec du PBS à 4°C tandis que les autres ont été incubées avec un anticorps anti-fragment Fc des IgG (humain, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) à 1µg/cm^2 sur la nuit à 4°C. Enfin ces lamelles ont été incubées pendant 2h avec de la N-cadhérine recombinante (Ncad-Fc) à 1µg/cm^2 à température ambiante.

Plasmides et anticorps

La construction EB3-GFP a été obtenue de F. Niedergang, Institut Cochin, Paris et EB3-mCherry de A. Andrieux, Institut des Neurosciences, Grenoble. La construction du mutant dominant négatif de la N-cadhérine, sans domaine extracellulaire et avec un tag myc est celle utilisée pour la première partie des résultats et décrite dans (Riedl et al., 2008 ; Lelièvre et al., 2012). La construction du domaine MOD avec un tag GFP de l'α-caténine a été construite dans l'équipe (Cécile Boscher et Mireille Lambert) et est composée des acides aminés 491 à 660 de l'α-caténine. Le plasmide permettant l'expression de la GFP pour l'électroporation *in utero* est le plasmide pCAGGs-eGFP (Tanaka et al., 2009) de Christine Métin, Institut du Fer à Moulin, Paris. Nous avons utilisé dans cette étude les anticorps anti-β-caténine (lapin, polyclonal, Sigma) et anti-tubuline α tyrosinée (souris, monoclonal, Sigma). L'actine a été révélée grâce à la phalloïdine Alexa-647 de chez Molecular Probes.

Electroporation in utero et électroporation de cellules dissociées

Les électroporations *in utero* ciblant les hippocampes ont été réalisées sur des embryons de rat à E16.5 grâce à l'aide de Lucie Viou, étudiante en thèse sous la direction de Christine Métin. Des capillaires de verre (Narishige, Japan) ont été étirés et calibrés pour des injections de plasmide de 2-3 µl. Après injection de la solution plasmidique dans le ventricule latéral du cerveau de chaque embryon, 5 pulses séparés de 1s ont été appliqués, à 50V pendant 50ms (électrodes LF650P2; BEX) (orientation des électrodes : électrode (+) en position caudale et électrode (-) en position rostrale de la tête de l'embryon). Les embryons ont été ensuite disséqués à E18.5.

Les électroporations sur cellules d'hippocampe dissociées ont été réalisées grâce au système Amaxa selon les instructions du fabricant (programme d'électroporation utilisé : G-013). Pour chaque électroporation 4 à 5.10^6 cellules ont été utilisées en présence de 1,5µg de chaque construction. Les cellules ont été ensuite mises en culture sur les substrats appropriés.

Immunofluorescence : fixation et marquages

Les cellules ont été fixées pendant 15 minutes avec une solution de paraformaldéhyde à 4%-sucrose 0,33M préchauffée à 37°C. Les préparations ont été ensuite perméabilisées avec une solution de Triton X-100 à 0,15% pendant 5 minutes et saturées pendant 1h avec de la BSA diluée dans du PBS à 1,5%. Les anticorps primaires sont ensuite incubés pendant 2h à température ambiante puis les anticorps secondaires (Jackson Laboratories) pendant 1h à température ambiante. Si le marquage de l'actine était requis, la phalloïdine a été incubée pendant 45 minutes à température ambiante.

Microscopie et acquisitions

Les marquages immunofluorescents ont été observés aux objectifs 63X ou 40X d'un microscope à épifluorescence (DM 6000 Leica) et les captures d'images réalisées grâce à une caméra CCD Micromax (Roper Scientific) piloté par le logiciel MetaMorph ; ou par microscopie confocale (Fv10i, Olympus).
Pour les expériences de vidéomicroscopie le milieu de culture a été remplacé 30 minutes avant l'acquisition par du DMEM-F12 (Gibco) supplémenté en HEPES 10 mM, glucose 0,54 %, glutamine 2mM, pytuvate de sodium 2 mM. Les acquisitions ont été réalisées sur un microscope inversé Leica DMI4000 avec un objectif 63X, couplé à un module de spinning disk confocal (tête CS20, Yokogawa) et une caméra CCD (Quantem S12SC, Roper Scientific) pilotée par MetaMorph. Les images ont été acquises toutes les 100ms aux longueurs d'onde 491 et 561nm (temps d'exposition 100ms). La température a été maintenue à 37°C grâce à une enceinte thermostatée (Life Imaging).

Analyse d'image, quantification et statistiques

Les analyses d'image et les quantifications ont été réalisées grâce au logiciel NIH ImageJ et les statistiques avec le logiciel GraphPad Prism.
Le déplacement des neurones sur substrats de poly-DL-ornithine et Ncad-Fc a été suivi manuellement grâce au plugin MTrackJ (Meijering et al., 2012).
La détermination de la vitesse moyenne de déplacement des protéines des bouts (+) EB3 dans les neurites a été effectuée grâce à des kymographes. Une ligne de 3 pixels de large a été dessinée le long des neurites afin de générer un kymographe grâce au logiciel ImageJ. Ces kymographes donnent une représentation du signal fluorescent en 2D (temps en fonction de la distance). La vitesse moyenne de déplacement des comètes d'EB3 a été obtenue par le calcul de la valeur des pentes des signaux fluorescents.

2. Résultats -discussion

2.1. Comportement des neurones d'hippocampe après activation de la N-cadhérine

2.1.1. La N-cadhérine stimule très précocement la croissance neuritique

Des résultats antérieurs ont décrit que l'engagement de la N-cadhérine stimulait fortement la croissance neuritique de neurones d'hippocampe (Bard et al., 2008; Boscher and Mege, 2008) et augmentait la motilité du cône de croissance. Afin d'étudier l'impact de l'engagement de la N-cadhérine aux stades précoces de la morphogenèse neuronale, des neurones d'hippocampe de rat ont été ensemencés sur des substrats Ncad-Fc ou de poly-ornithine (PO). Nous avons fixé ces neurones une heure après leur étalement sur substrats de Ncad-Fc et de PO (figure 41). De manière impressionnante les neurones adhérant sur substrat N-cadhérine possèdent des neurites déjà formés après 1h d'étalement (figure 41A), contrairement à la majorité des neurones sur PO qui n'ont pas encore dépassé le premier stade de la morphogenèse neuronale (figure 41B). Par ailleurs les immunomarquages effectués révèlent que la β-caténine est accumulée à l'extrémité des neurites, suivi de l'actine puis des microtubules. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus avec les cellules myogéniques C2C12. Cependant nous ne pouvons pas exclure le fait que la β-caténine puisse être localisée à l'extrémité des protrusions de manière indépendante des cadhérines (Faux et al., 2010).

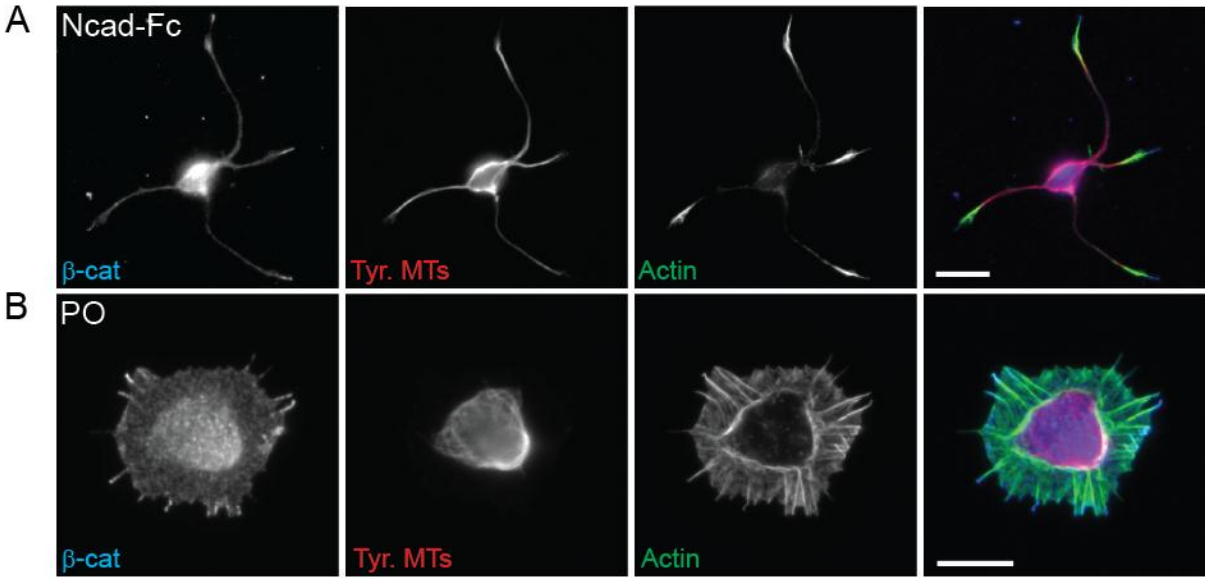


Figure 41 | La N-cadhérine stimule la croissance neuritique dès les premiers stades de la morphogenèse neuronale.
Après 1h de culture sur substrats de Ncad-Fc (A) et de PO (B), la β-caténine (bleu) et les microtubules tyrosinés (rouge) ont été révélés par des marquages immunofluorescents et l'actine par de la phalloïdine (vert). Sur substrat Ncad-Fc les neurones ont déjà formé des neurites tandis que sur PO les neurones sont toujours au premier stade de la morphogenèse. Barre d'échelle 10µm.

2.1.2. L'engagement de la N-cadhérine modifie la morphologie des cônes de croissance

Nous avons ensuite fixé les neurones après 24h de mise en culture sur substrats. Nous avons pu observer après 24 heures de culture une différence de morphologie des cônes de croissance des neurones sur N-cadhérine par rapport aux neurones sur PO (figure 42). Les neurones adhérant spécifiquement par des contacts N-cadhérine possèdent en grande majorité des cônes de croissance relativement fins avec des microtubules explorant peu la surface du cône de croissance (figure 42A). Inversement les neurones sur substrat de PO arborent des cônes de croissance très étalés avec un réseau de microtubules moins condensé à la base du cône et pénétrant un peu plus le domaine périphérique (figure 42B). Cette morphologie des cônes de croissance sur Ncad-Fc serait en accord avec une stimulation de la dynamique des cônes de croissance par la N-cadhérine (Bard et al., 2008).

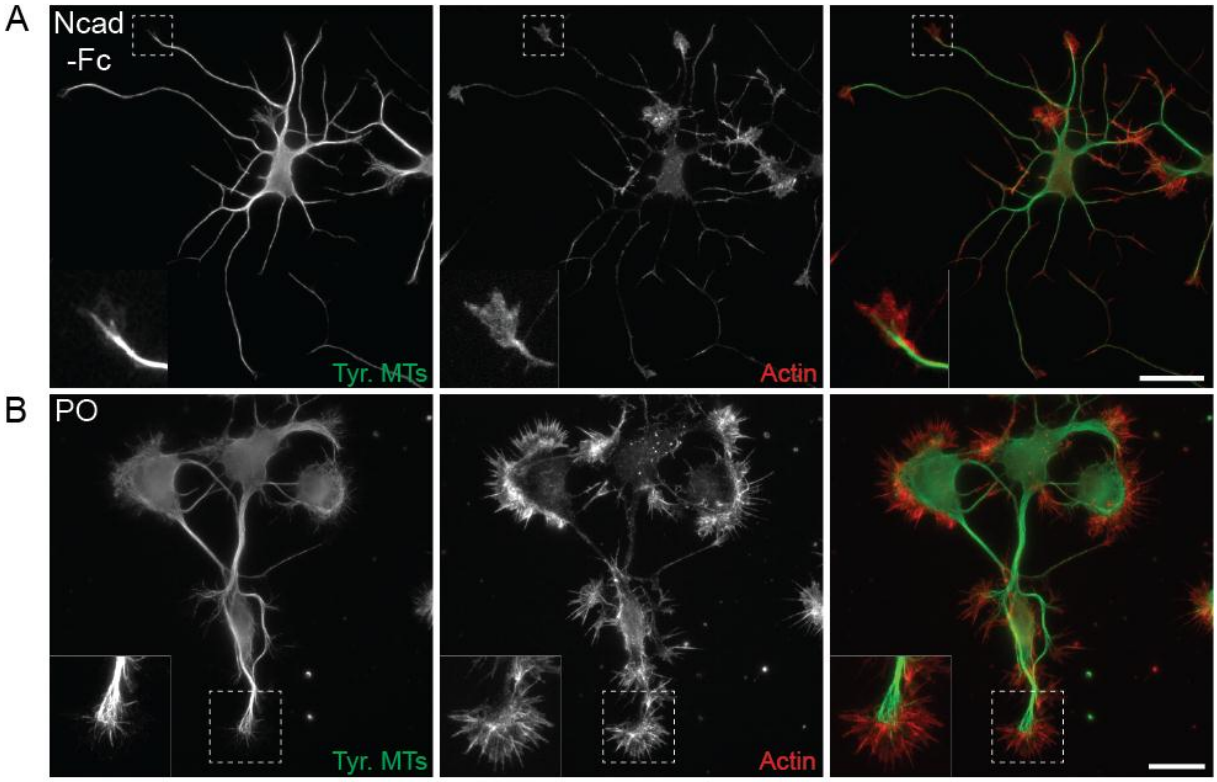


Figure 42 | La surface des cônes de croissance diminue lorsque les neurones établissent des contacts dépendants de la N-cadhérine.
Les neurones d'hippocampe de rat ont été déposés sur Ncad-Fc (A) ou PO (B) et mis en culture en l'absence de facteurs de croissance pendant 24h. Après fixation, les cellules ont subi des immunomarquages révélant les microtubules tyrosinés (vert, Tyr. MTs) et l'actine a été révélée par de la phalloïdine (rouge). Lorsque les neurones sont sur des substrats de Ncad-Fc les cônes de croissance des neurones sont peu étalés (grossissement en encadré), à l'inverse des neurones adhérant sur PO qui présentent des cônes de croissance avec un lamellipode très important. Barre d'échelle 20µm.

2.1.3. La N-cadhérine stimule la motilité des corps cellulaires

Nous avons ensuite voulu caractériser le comportement des neurones d'hippocampe pendant cette phase d'étalement de 24 heures, c'est pourquoi nous avons filmé en contraste de phase les neurones 1 heure après les avoir mis en culture (figure 43). Nous avons pu observer de manière surprenante que les neurones sur Ncad-Fc montrent une grande motilité de leurs cônes de croissance mais aussi de leurs corps cellulaires (figure 43A) par rapport aux neurones sur PO qui ne se déplacent quasiment pas (figure 43B). Ces résultats suggèrent que la N-cadhérine stimulerait la migration de ces neurones.

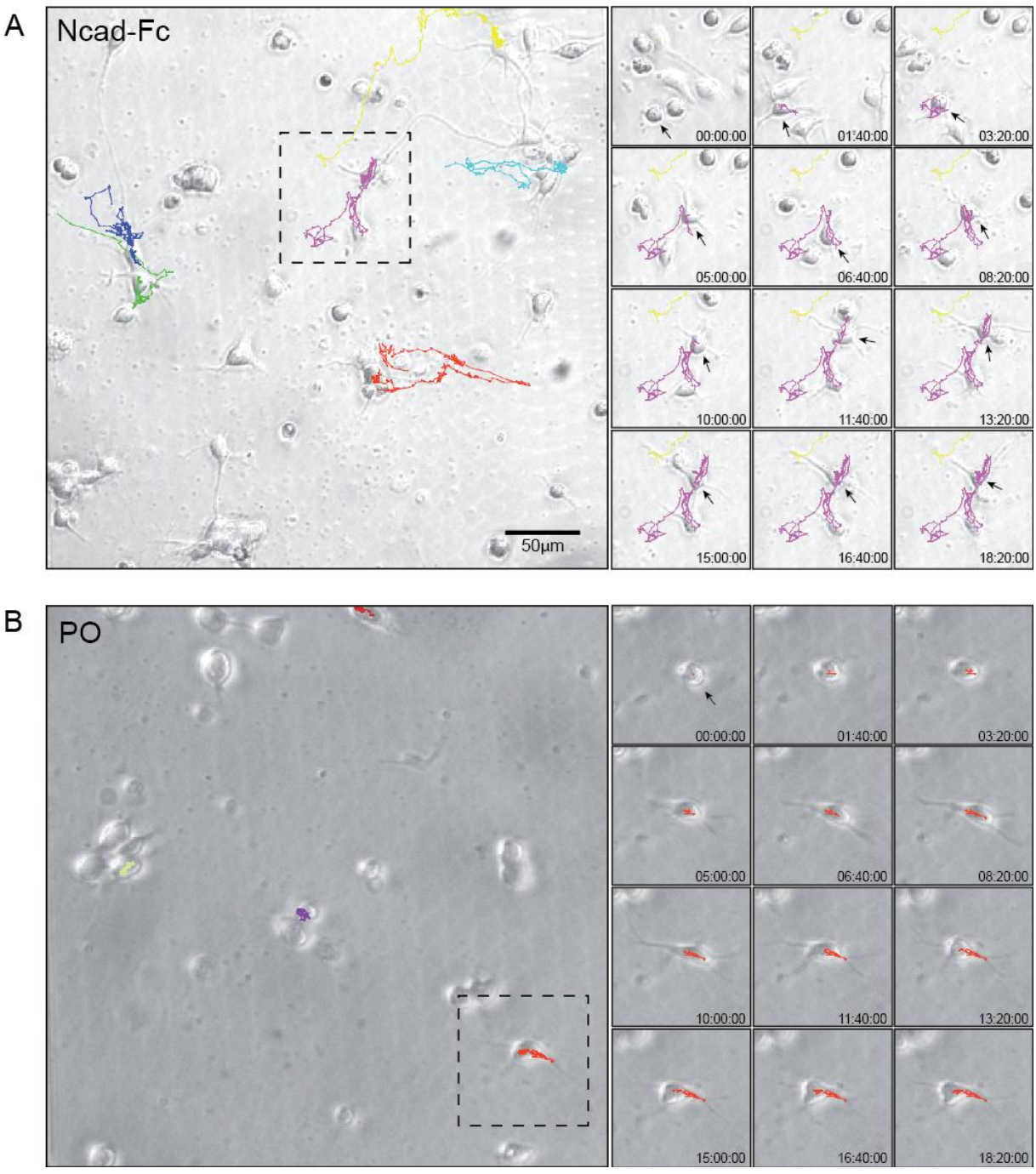


Figure 43 | **L'engagement de la N-cadhérine stimule la motilité du corps cellulaire des neurones.**
Les neurones ont été déposés sur des substrats de Ncad-Fc (A) ou de PO (B) et mis en culture en l'absence de facteurs de croissance pendant 1h, puis les neurones ont été filmés pendant 20h en contraste de phase avec des acquisitions réalisées à des intervalles de 5 minutes. Le déplacement des corps cellulaires a été suivi par un tracking manuel sous ImageJ (plugin MTrackJ) et leur trajectoire est visualisée par un trait de couleur. A droite du panneau central est représentée la séquence de la zone encadrée, à des intervalles de 1h40min.

2.2. Influence de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules

2.2.1. La N-cadhérine stimule la dynamique des microtubules

Nous avons poursuivi l'étude du rôle de la N-cadhérine au cours de la croissance neuritique et de son influence sur le cytosquelette. Des travaux antérieurs réalisés par Bard et collaborateurs ont mis en évidence que la stimulation de la croissance neuritique par la N-cadhérine était due à son ancrage au cytosquelette d'actine (Bard et al., 2008). Nous avons donc voulu tester quelle était l'influence de l'adhésion N-cadhérine sur les microtubules, qui sont un élément du cytosquelette également important pour l'élongation neuritique (Dent et al., 2011). Pour cela nous avons évalué la dynamique des microtubules dans les neurites de neurones électroporés par EB3-GFP ou co-électroporés par EB3-GFP et le mutant DN Ncad. Ces neurones ont été mis en culture pendant 24h sur des substrats de PO et Ncad-Fc avant d'être filmés par un vidéomicroscopie puis la mesure de la vitesse moyenne des comètes EB3 a été analysée par kymographe (figure 44A). Nous avons pu constater que lorsque les neurones adhéraient sur des substrats de N-cadhérine, la vitesse moyenne des microtubules dans le neurite était environ 1,25 fois plus élevée que sur substrat de PO (figure 44B). Lorsque les neurones sont co-électroporés avec le mutant DN Ncad, l'effet stimulateur du substrat Ncad-Fc est annulé et ne modifie pas la vitesse moyenne des comètes sur PO. Ces résultats indiquent que la N-cadhérine, en plus de promouvoir la croissance neuritique, stimule la vitesse moyenne de progression des microtubules dans les neurites.

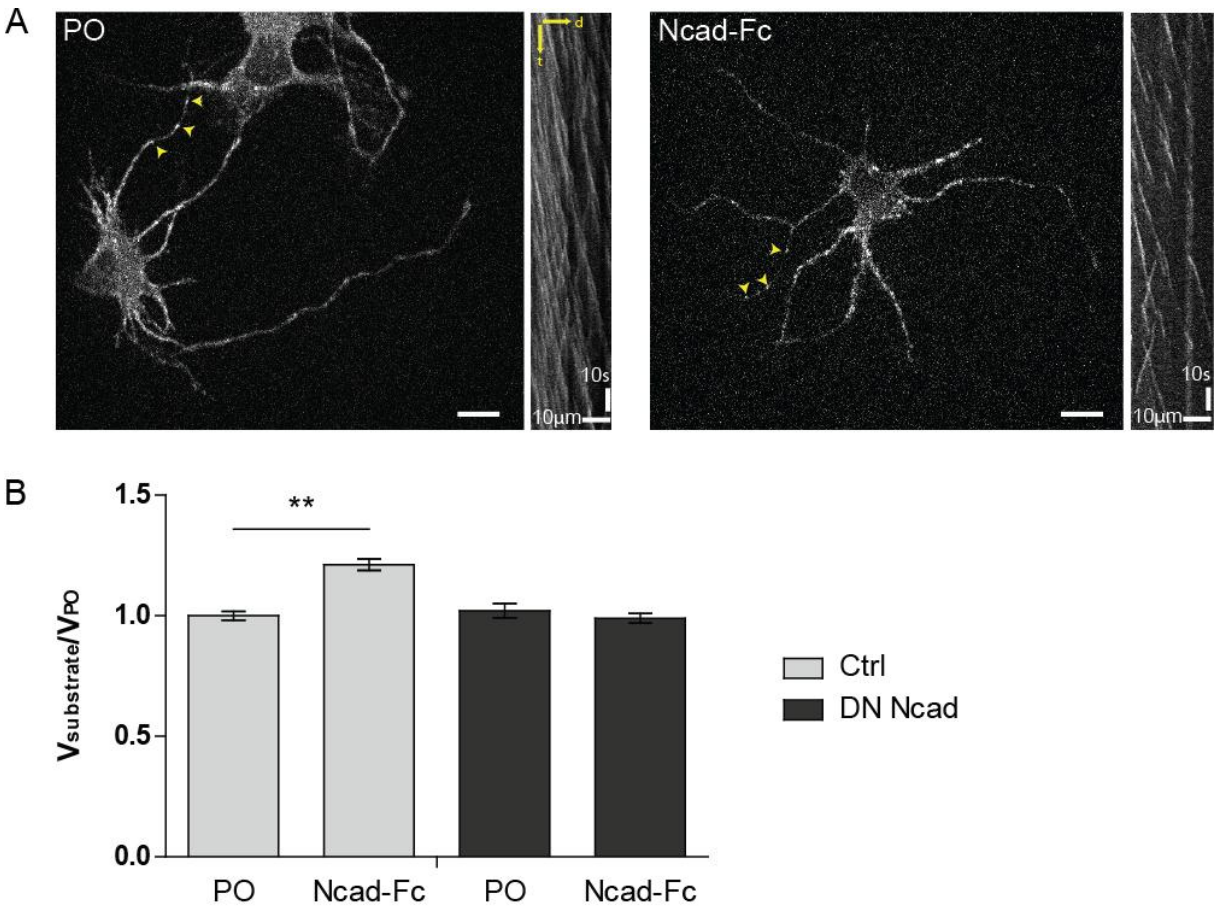


Figure 44 | **La dynamique des microtubules est stimulée par l'engagement de la N-cadhérine.**
Les neurones ont été électroporés par EB3-GFP (Ctrl) ou co-électroporés avec un mutant dominant négatif de N-cadhérine (DN Ncad), avant d'être mis en culture sur des substrats Ncad-Fc ou PO pendant 24h. (A) Le déplacement des comètes EB3-GFP (têtes de flèche jaunes) a été enregistré par vidéomicroscopie avec un spinning disk et la vitesse moyenne de déplacement a été quantifiée par analyse de kymographes. Ne sont représentés ici que des neurones transfectés par EB3-GFP (barre d'échelle 10 µm), les kymographes correspondant étant à droite de l'image (la région illustrée est le neurite portant les têtes de flèche jaunes). (B) Les vitesses moyennes de déplacement des comètes ont été rapportées à celles des neurones dans la condition Ctrl sur PO. En condition Ctrl la vitesse moyenne des comètes est augmentée de manière significative sur substrat Ncad-Fc ($p<0,05$). Après expression du mutant de la N-cadhérine la vitesse moyenne des comètes est identique sur PO et sur Ncad-Fc, révélant une inhibition de l'effet stimulateur du substrat Ncad-Fc par le mutant DN Ncad. Test statistique de Mann-Whitney. 2 expériences indépendantes, 18 neurones pour (Ctrl, PO), 21 neurones pour (Ctrl, Ncad-Fc), 12 neurones pour (DN Ncad, PO), 20 neurones pour (DN Ncad, Ncad-Fc), et respectivement un total de 325, 311, 172 et 416 comètes analysées.

2.2.2. Régulation de la dynamique des microtubules par l'α-caténine

Afin de tenter de décrypter les mécanismes moléculaires de la régulation de la dynamique des microtubules par la N-cadhérine, nous avons tenté de perturber l'association de l'α-caténine à l'actine en surexprimant le fragment 491-660 de l'α-caténine, correspondant au domaine de modulation (MOD). Ce domaine MOD serait capable d'interagir avec le domaine de liaison à la vinculine de l'α-caténine, induisant une conformation fermée de la protéine (Yonemura et al., 2010). Des expériences réalisées par Cécile Boscher (résultats non publiés) ont démontré que la

surexpression du domaine MOD inhibait significativement la croissance neuritique sur substrat N-cadhérine, suggérant un rôle de dominant négatif de cette construction.

Lorsque nous avons transfecté des neurones d'hippocampe avec ce domaine MOD de l'α-caténine, nous avons pu observer une diminution de la vitesse moyenne des microtubules sur substrats Ncad-Fc. L'influence de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules pourrait donc être transmise grâce à l'intermédiaire de l'α-caténine.

Cependant nous avons également observé une diminution de la dynamique des microtubules suite à l'expression du domaine MOD sur PO (figure 45). Ces résultats préliminaires suggèrent que l'α-caténine pourrait influencer la dynamique des microtubules de manière indirecte. Il faudra répéter ces expériences et poursuivre l'étude afin de déterminer si la régulation des microtubules pourrait être régulée à la fois par les complexes cadhérines/caténines et par l'α-caténine. En effet il a été décrit que l'α-caténine était également capable de réguler la dynamique de l'actine de manière indépendante des adhésions E-cadhérine (Benjamin et al., 2010). Nous pourrions supposer que l'α-caténine régule le cytosquelette d'actine et que cela influence de manière indirecte la dynamique des microtubules.

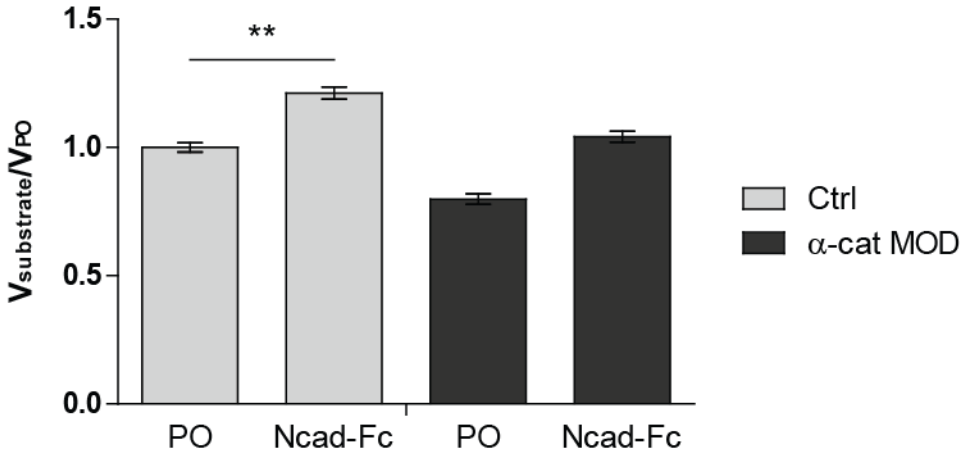


Figure 45 | L'α-caténine influence la dynamique des microtubules.
Les neurones ont été électroporés par EB3-mCherry (Ctrl) ou par EB3-mCherry et le domaine MOD de l'α-caténine fusionné à la GFP (α-cat MOD), avant d'être mis en culture sur des substrats Ncad-Fc et PO pendant 24h. Le déplacement des comètes EB3-mCherry a été enregistré par vidéomicroscopie et la vitesse moyenne de déplacement a été quantifiée par analyse de kymographes. Les vitesses moyennes de déplacement des comètes ont été reportées à celles des neurones de la condition Ctrl sur PO. L'expression du domaine MOD diminuerait la vitesse moyenne des comètes EB3-GFP sur substrat Ncad-Fc mais également sur PO, suggérant un effet non entièrement dépendant de l'adhésion cadhérine. L'expérience pour tester l'impact de l'expression du domaine MOD de l'α-caténine n'a été effectuée qu'une seule fois. Les valeurs pour les conditions contrôles sont celles de la figure 44. 2 expériences indépendantes pour la condition Ctrl, au total 18 neurones pour (Ctrl, PO), 21 neurones pour (Ctrl, Ncad-Fc), 3 neurones pour (α-cat MOD, PO), 11 neurones pour (α-cat MOD, Ncad-Fc), et respectivement un total de 325, 311, 51 et 219 comètes analysées.

2.3. Rôle de la N-cadhérine au cours de la neuritogenèse

Etant donné que l'adhésion N-cadhérine stimule la croissance neuritique dès les premiers stades de la morphogenèse neuronale, nous nous sommes demandés si elle était uniquement un paramètre stimulant la croissance neuritique ou si elle était impliquée dans les processus de

neuritogenèse, les deux possibilités n'étant pas exclusives. Pour savoir si l'adhésion N-cadhérine est nécessaire pour l'initiation de la formation d'un neurite, nous avons cherché à perturber la cadhérine endogène en exprimant un mutant ne possédant pas de domaine extracellulaire de la N-cadhérine (Riehl et al., 1996). Dans un premier temps nous avons électroporé des neurones dissociés avec des constructions de la N-cadhérine sauvage et mutante (DN Ncad). Nous avons ensuite déposé ces neurones dans des gouttes à l'intérieur d'un couvercle d'une boîte de culture afin de les laisser en suspension pendant la nuit, afin que les constructions aient le temps d'être exprimées. Cependant les neurones s'agrégeaient de manière trop importante et formaient des clusters empêchant toute analyse (résultats non montrés). Nous avons donc changé de méthode et co-électroporé *in utero* les hippocampes de rat au stade E16.5 avec de la GFP avec ou sans N-cadhérine mutante. Afin de vérifier le bon ciblage de l'hippocampe, nous avons ensuite disséqué et dissocié les hippocampes au stade E18.5 (figure 46). Après 24h de culture nous avons pu constater que dans les deux conditions les neurones étaient bien transfectés et formaient des neurites.

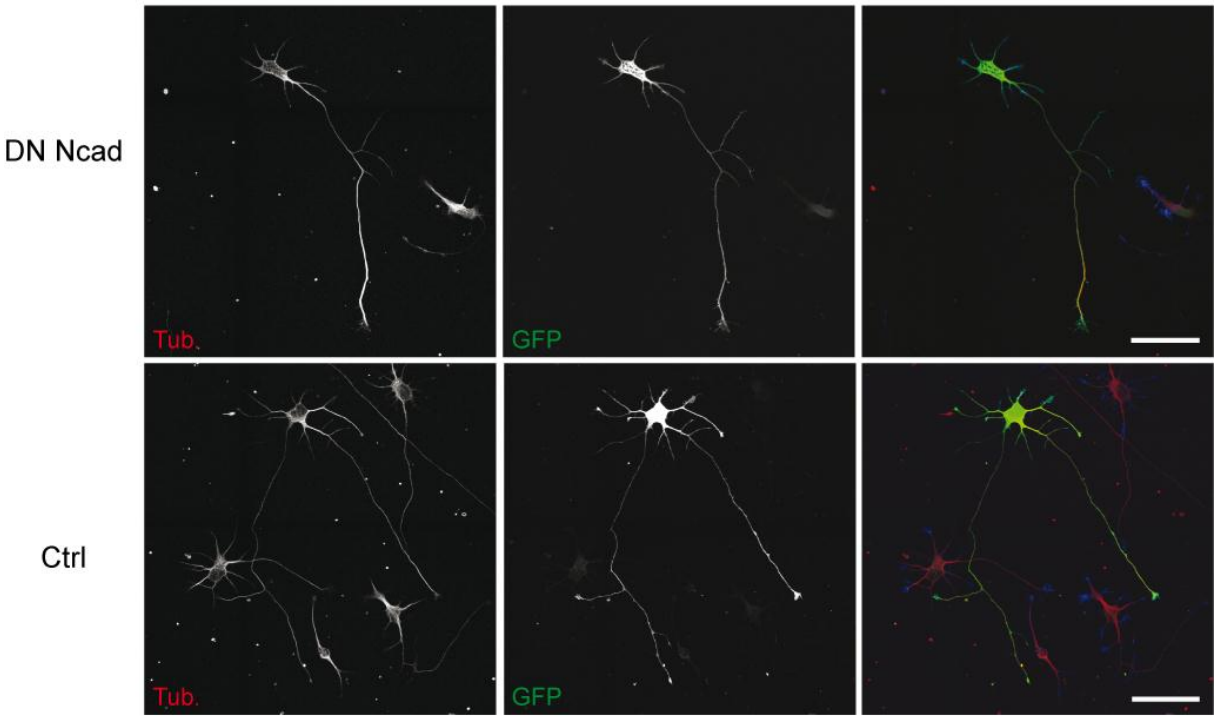


Figure 46 | Electroporation *in utero* du mutant N-cadhérine et étalement sur substrat Ncad-Fc.
L'hippocampe d'embryons de rat a été électroporé *in utero* à E16.5 par de la GFP (Ctrl) ou co-électroporé par de la GFP et le mutant dominant négatif de la N-cadhérine (DN Ncad). A E18.5 les hippocampes ont été prélevés, dissociés et mis en culture pendant 24h sur substrat de Ncad-Fc. La tubuline (tubuline βIII, rouge) a été révélée par immunomarquage. Les neurones sont capables de former des neurites même lorsqu'ils expriment la N-cadhérine mutante. Barre d'échelle 50µm.

Nous n'avons pas encore quantifié si la perturbation de l'adhésion N-cadhérine par expression de ce mutant DN Ncad inhibait la croissance neuritique comme décrit (Bard et al., 2008). Donc la prochaine étape sera de quantifier la longueur des neurones étalés sur Ncad-Fc et PO. Ensuite il faudra analyser la capacité des neurones à former des neurites après électroporation des hippocampes sur des tranches de cerveaux. Une alternative à l'utilisation du

mutant DN Ncad serait d'électroporer des shRNA de la N-cadhérine. Par ailleurs une étude très récente a montré que la N-cadhérine serait impliquée dans la polarisation neuronale permettant la neuritogenèse (Gartner et al., 2012). Gärtner et collaborateurs ont notamment utilisé un mutant de la N-cadhérine (le même que Fujimori et collaborateurs (Fujimori and Takeichi, 1993)) au cours d'expériences d'électroporation *in utero* de cortex de souris et ont pu mettre en évidence que les neurones perdaient leur polarisation, perturbant l'orientation de leur migration radiale. Nous devrons donc approfondir notre étude afin de comprendre comment la N-cadhérine permet l'émergence d'un neurite, et si pour cela elle influence l'organisation du cytosquelette d'actine et de microtubules.

En conclusion nous pouvons clairement établir un lien entre l'engagement de la N-cadhérine et l'augmentation de la dynamique des microtubules. A l'avenir il sera très intéressant de savoir s'il existe un lien entre la stimulation de la dynamique des microtubules et celle de la croissance neuritique. Par ailleurs il sera également intéressant d'explorer plus largement le rôle de l'actine, afin de savoir si elle intervient dans la régulation des microtubules par les cadhérines.

Travail annexe

N-cadherin mediates neuronal cell survival through Bim down regulation.

Elise Lelièvre [1], Charlotte Plestant [1], Cécile Boscher, Emeline Wolff, René-Marc Mège [2] and Hélène Birbes [2]

PLoS ONE (2012) 7(3): e33206. doi:10.1371/journal.pone.0033206.
[1] Equal contribution to this work, [2] co-last authors

Travail annexe (article publié) : La N-cadhérine favorise la survie neuronale via l'inhibition de Bim

N-cadherin mediates neuronal cell survival through Bim down-regulation

Elise Lelièvre [1], Charlotte Plestant [1], Cécile Boscher, Emeline Wolff, René-Marc Mège [2] and Hélène Birbes [2].
PLoS ONE (2012) 7(3): e33206. doi:10.1371/journal.pone.0033206.
[1] Equal contribution to this work, [2] co-last authors.

L'engagement des cadhérines au sein des interactions cellule-cellule est important pour un grand nombre de processus tels que le maintien de la cohésion cellulaire au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Il a été proposé en particulier que les contacts effectués par les cadhérines puissent êtreimpliqués dans la régulation de la balance survie/mort des cellules. En effet la dissociation des contacts dépendants des cadhérines a été démontrée comme responsable de l'induction de l'apoptose dans des cellules épithéliales dans certaines conditions (Bergin et al., 2000; Hermiston and Gordon, 1995; Hofmann et al., 2007). L'étude présentée ici a eu pour objectif de savoir si les cadhérines étaient également capables d'influer sur la balance survie/apoptose des cellules neuronales.

Pour cela différents types de cellules neuronales primaires : neurones d'hippocampe de rat et neurones spinaux de souris, ainsi qu'une lignée neuronale GT1-7, ont été utilisés dans des tests de survie. Les cellules ont été étalées sur N-cadhérine recombinante et le taux de survie a été évalué. Les analyses ont révélé que l'adhésion dépendante de la N-cadhérine promouvait la survie de tous ces types de neurones.

La question qui s'est posée ensuite a été de comprendre par quelle voie de signalisation les cadhérines transmettaient un signal promouvant la survie. Des études biochimiques ont permis d'exclure l'implication de la voie de survie PI3-kinase/Akt (Grossmann, 2002). Cependant les expériences ont révélé que l'adhésion N-cadhérine entraînait une diminution de la quantité totale de la protéine Bim, une protéine pro-apoptotique (Cory and Adams, 2002). Grâce à l'utilisation de drogues inhibant la voie des MAP kinases il a été démontré que l'engagement de la N-cadhérine induisait l'activation des kinases Mek1/2 et par conséquent des kinases Erk1/2. L'activation des kinases Erk1/2 entraîne la phosphorylation de Bim et mène à la dégradation de la protéine pro-apoptotique, processus tous deux bloqués par des inhibiteurs des Erk1/2. Ces travaux suggèrent donc que suite à l'engagement de la N-cadhérine, la protéine Bim est dégradée et cela favorise donc la survie des cellules neuronales. Par ailleurs des travaux récents réalisés dans l'équipe par Camilla Luccardini (résultats non publiés) montrent que l'extinction de l'expression de la N-cadhérine dans les interneurones de l'éminence ganglionnaire médiane au cours du développement embryonnaire de souris augmente le taux d'apoptose des interneurones, confirmant le rôle neuroprotecteur des contacts dépendants de la N-cadhérine.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

N-Cadherin Mediates Neuronal Cell Survival through Bim Down-Regulation

Elise C. Lelièvre[1,2,3☯], Charlotte Plestant[1,2,3☯], Cécile Boscher[1,2,3¤], Emeline Wolff[1,2,3], René-Marc Mège[1,2,3*¶], Hélène Birbes[1,2,3*¶]

1 INSERM, UMRS-839, Paris, France, **2** Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France, **3** Institut du Fer à Moulin, Paris, France

Abstract

N-cadherin is a major adhesion molecule involved in the development and plasticity of the nervous system. N-cadherin-mediated cell adhesion regulates neuroepithelial cell polarity, neuronal precursor migration, growth cone migration and synaptic plasticity. In vitro, it has been involved in signaling events regulating processes such as cell mobility, proliferation and differentiation. N-cadherin has also been implicated in adhesion-dependent protection against apoptosis in non-neuronal cells. In this study, we investigated if the engagement of N-cadherin participates to the control of neuronal cells survival/death balance. We observed that plating either primary mouse spinal cord neurons or primary rat hippocampal neurons on N-cadherin recombinant substrate greatly enhances their survival compared to non-specific adhesion on poly-L-lysine. We show that N-cadherin engagement, in the absence of other survival factors (cell-matrix interactions and serum), protects GT1-7 neuronal cells against apoptosis. Using this cell line, we then searched for the signaling pathways involved in the survival effect of N-cadherin engagement. The PI3-kinase/Akt survival pathway and its downstream effector Bad are not involved, as no phosphorylation of Akt or Bad proteins in response to N-cadherin engagement was observed. In contrast, N-cadherin engagement activated the Erk1/2 MAP kinase pathway. Moreover, N-cadherin ligation mediated a 2-fold decrease in the level of the pro-apoptotic protein Bim-EL whereas the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was unchanged. Inhibition of Mek1/2 kinases with U0126, and the resulting inhibition of Erk1/2 phosphorylation, induced the increase of both the level of Bim-EL and apoptosis of cells seeded on the N-cadherin substrate, suggesting that Erk phosphorylation is necessary for cell survival. Finally, the overexpression of a phosphorylation defective form of Bim-EL prevented N-cadherin-engagement induced cell survival. In conclusion, our results show that N-cadherin engagement mediates neuronal cell survival by enhancing the MAP kinase pathway and down-regulating the pro-apoptotic protein Bim-EL.

Citation: Lelièvre EC, Plestant C, Boscher C, Wolff E, Mège R-M, et al. (2012) N-Cadherin Mediates Neuronal Cell Survival through Bim Down-Regulation. PLoS ONE 7(3): e33206. doi:10.1371/journal.pone.0033206

Editor: Masuko Ushio-Fukai, University of Illinois at Chicago, United States of America

Received December 9, 2010; **Accepted** February 11, 2012; **Published** March 12, 2012

Copyright: © 2012 Lelièvre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by institutional funding from INSERM (Institut National de la Santé et Recherche Médicale), Université Pierre et Marie Curie, as well as grants from AFM (Association Française contre les Myopathies) and ARC (Association Française de Recherche contre le Cancer). Dr. Lelièvre, Dr. Plestant and Dr. Boscher have been supported by French Research Ministry graduate student fellowships. ARC provided also Dr. Boscher with a PhD fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rene-marc.mege@inserm.fr (RMM); helene.birbes@inserm.fr (HB)

¤ Current address: Department of Cellular and Physiological Sciences, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

☯ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Cadherins are a family of transmembrane proteins that mediate calcium-dependent homophilic cell-cell contacts. They provide anchorage in between neighboring cells by interacting with the actin cytoskeleton through catenins [1]. Cadherins play crucial roles in embryonic morphogenesis by affecting cell shape, differentiation, migration and proliferation [2]. In addition, cadherin-mediated cell-cell interactions may regulate the balance between cell survival and cell death during development and maintenance of tissue homeostasis. Indeed several studies have reported that disruption of cadherin adhesion initiates apoptosis in various epithelial [3,4,5] and tumor cells [6,7,8,9]. However, the mechanisms whereby cadherin adhesion contributes to cell fate by regulating the survival/cell death balance is poorly understood by comparison to the well-known molecular mechanism of anoïkis (apoptosis induced by the loss of cell contacts with the extracellular matrix (ECM)) [10]. Depending on cell types, the initiation and execution of anoïkis, which is refrained in physiological conditions by integrin engagement, is mediated by different pathways that all converge to the regulation of anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, leading to activation of caspases and subsequent activation of endonucleases, DNA fragmentation and eventually cell death [10].

Proteins of the Bcl-2 family are major regulators of apoptosis [11]. Anti-apoptotic members, such as Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 contain four Bcl-2 homology (BH) domains while the pro-apoptotic proteins fall into two categories: the Bax-like proteins, such as Bax and Bak that contain multiple BH domains, and the BH3-only members, Bad, Bid, Bmf, and Bim that contain only the BH3 domain. These pro-apoptotic proteins promote the release of apoptogenic factors from the mitochondria. Several studies

indicate that the BH3-only members bind to the pro-survival Bcl-2 proteins and neutralize them, thereby allowing Bax-like proteins to initiate apoptosis [12]. The different BH3-only members respond to different forms of cellular stress and are subject to regulation at both transcriptional and posttranslation levels. During anoïkis, activation of MAP kinase, PI-3 kinase/Akt and JNK pathways regulate Bcl-2 family members such as the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins or the pro-apoptotic proteins Bad or Bim [10]. Bim primary transcripts undergo alternative splicing to generate three major isoforms: Bim-S, Bim-L and Bim-EL, the latter representing the predominant isoform in most tissues [13]. Bim-EL is up-regulated during anoïkis while its down-regulation by RNA interference inhibits anoïkis [14]. It has been established that Bim acts as a critical mediator of neuronal apoptosis [13,15,16,17]. Indeed, Putcha et al., have reported that Nerve Growth Factor (NGF) deprivation in sympathetic neurons rapidly induced expression of Bim-EL [16]. Conversely, Bim deletion conferred protection against cytochrome c release and neuronal apoptosis upon NGF deprivation. Similar protective effect of Bim deletion against apoptosis was observed in cerebellar granule neurons subjected to K^+ withdrawal [16].

N-cadherin is the predominant form of cadherin expressed ubiquitously in the early neural tube [18]. N-cadherin participates to the development and functional organization of the adult neural tissue [19]. This receptor is necessary for the polarisation of the neuroepithelial sheets, the radial organization of developing cortical plate and likely the migration of neuronal precursors [20]. It is also implicated in neurite outgrowth, dendritic arborization, axon guidance, and in the early stages of synaptogenesis [21]. Later in development, N-cadherin localizes at synapses [22], where it not only plays an adhesive role but also participates to the regulation of synaptic function and plasticity [23,24,25]. In this study, we assessed whether cadherin-mediated cell-cell adhesion provides a survival signal for neuronal cells and thereby focused our study on the contribution of N-cadherin. For that purpose, we used an immobilized N-cadherin (N-cad) recombinant protein coated on culture plates mimicking cell-cell contact formation to tightly control cadherin engagement [26,27]. Controlled mobilization of N-cadherin was shown to induce cell cycle exit and myogenic differentiation [28] and to promote neurite outgrowth [29,30]. Our work demonstrates that N-cadherin-mediated adhesion provides neuronal cells with pro-survival signal, protecting them from apoptosis in the absence of growth factors and extracellular matrix stimuli. In addition, we describe a molecular pathway by which cadherin regulates cell survival. Indeed, we report that the engagement of N-cadherin results in the phosphorylation of Erk1/2 and the down-regulation of the pro-apoptotic protein Bim, whereas the PI3-kinase/Akt survival pathway and Bcl-2 protein are not affected.

Materials and Methods

Antibodies and reagents

The following antibodies were used for western blotting : rabbit anti-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), rabbit anti-phospho-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology), rabbit anti-Erk1/2 (1/10000; Upstate Biotechnology, Inc. Lake Placid, NY), mouse anti-phospho-Erk1/2 (1/10000; Sigma), mouse anti-Bcl-2 (1/500; Transduction Laboratories, Becton Dickinson Europe, Le Pont de Claix, France), rabbit anti-Bcl-xL (1/1000; Cell Signaling Technology), rabbit anti-Bim (1/1000; Pharmingen, San Diego, CA), rabbit anti-phospho-Bad (1/1000; Cell Signaling Technology), rabbit anti-PARP (1/1000; Cell signalling Technology), mouse anti-β-actin (1/20000; clone AC-15; Sigma), mouse anti-α-tubulin (1:20000, clone E7, Developmental Studies Hybridoma Bank). Mouse anti-cytochrome c (1/200, clone 6H2.B4; Pharmingen) anti-βIII-tubulin (1/1000, clone Tuj1; Covance, CA) and anti-paxillin antibodies (1/100, Upstate Biotechnologies) monoclonal antibodies were used for immunostaining. 4′,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) was from Molecular Probes (Eugene, OR). U0126 and LY294002 were from Cell Signaling Technology, PMA was from Sigma, Triton X-100 was from Pierce.

The expression vector encoding for the dominant negative mutant form of N-cadherin deleted of its extracellular domain (DN-Ncad), initially described in [31], has been modified by replacing the Myc tag by the DsRed protein coding sequence [32]. The expression vectors coding for wild type Bim-EL and the ERK-dependent phosphorylation site defective mutant Bim-EL (S69G) have been described in [33].

Cell culture

Mouse GT1-7 cells [34] were grown at 37°C, 5%CO_2, in Dulbecco's Modified Eagle Medium with 4.5 g/l glucose (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, Life Technologies). GT1-7 cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Cells were seeded at 8.10^4 cells/cm^2 and transfected 24 hours later according to manufacturer's instructions.

Primary mouse ventral spinal cord and rat hippocampal neurons were prepared as previously described [35,36]. Briefly, ventral spinal cord of E12.5 mouse embryos from the OF1 pregnant mice were isolated and digested with trypsin for 10 min at 37°C in Ham F10 modified medium containing 0.025% trypsin. Tissues were then mechanically dissociated in L15 medium containing DNAse I and the supernatant was laid on a BSA 4% solution and centrifuged. Spinal cells were seeded on coated coverslips at 2.10^4 cells/cm^2 in Neurobasal medium containing 0.5 mM L-glutamine and cultivated for 24 hours to 48 hours at 37°C, 5% CO_2. Hippocampi from E18.5 rat embryos (Sprague Dawley pregnant rat, R. Janvier laboratories) were isolated in HBSS-20 mM Hepes and digested with trypsin 0,05% 10 min at 37°C, then mechanically dissociated. Hippocampal cells were recovered in MEM medium supplemented with 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and seeded on coated coverslips at 2.10^4 cells/cm^2 and cultivated for 24 hours at 37°C, 5% CO_2. All experiments with animals were in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry for handling animals (decree 87849, license 75–765-Renouvellement) and approved by the "Charles Darwin ethical committee in animal experimentation, Paris" under permit number Ce5/2010/064.

Substrates coating

Adhesive substrates were prepared as described in [28]. Briefly, glass coverslips or thermosterilized bacterial 35-mm Petri dishes (Falcon, Becton Dickinson Europe) were incubated with goat anti-mouse Fcγ fragment antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) at 1 µg/cm^2 in 0.1 M borate buffer pH 8.0 overnight at 4°C. Plates were washed and then incubated with purified Ncad-Fc chimera (extracellular domain of the chicken N-cadherin fused to the mouse IgG2b Fc fragment [27]) at a concentration of 1 µg/cm^2 for 2 hours at room temperature. For the control samples, glass coverslips or dishes were incubated with poly-L-lysine (PL, 0.01%, Sigma) or fibronectin (FN, 10 µg/cm^2, Invitrogen), in water overnight at 4°C. After washes, surfaces were then saturated with 1.5% purified BSA (Sigma) in PBS for 5–10 min at room temperature.

Controlled cell adhesion assays

Specific cell adhesion and spreading on coated surfaces were performed according to [28]. Briefly, to preserve cell-surface cadherins, twenty-four hours serum-starved GT1-7 cells were mechanical dissociated in trypsin-free conditions with PBS, 3.5 mM EDTA, 1.5% BSA on ice. Cells were then plated on the different adhesion substrates in serum-free conditions to prevent growth factors-mediated survival and at low cell density (8.10^4 cells/cm^2) to prevent cell-cell contacts between neighboring cells. For experiments using inhibitors, cells were incubated 1 hour with the specific inhibitor prior to mechanically dissociation and throughout culture on the different substrates with inhibitors at the concentrations and times indicated. To induce Bad and Erk1/2 protein phosphorylation, confluent cells were treated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 10 ng/ml for 1 hour.

Calcium switch assays

Confluent GT1-7 cell monolayers were deprived of serum for 24 hours, and the N-cadherin-mediated cell-cell contacts were disrupted by treatment with 4 mM EGTA in DMEM for 40 min at 37°C. The calcium-free medium was removed and N-cadherin contacts were allowed to re-establish by addition of DMEM, containing 1.8 mM Ca^{2+}. The time of re-addition of Ca^{2+} was considered as 0 min. Following calcium restoration at 37°C, cells were harvested, lysed, protein extracts separated by SDS-PAGE and immunoblotted as described below.

Alternatively, serum deprived GT1-7 cells were maintained in suspension in 1% agarose coated 60 mm culture dishes (10.10^4 cells/dish) to prevent cell attachment. Cells were either incubated in the presence of 1.8 mM Ca^{2+} (provided by the DMEM medium) or in the presence of DMEM plus 2.5 mM EDTA (0 mM free Ca^{2+}) to prevent cadherin-dependent cell-cell adhesion. At various time points, cells were washed once with cold PBS, collected and processed for analysis of PARP cleavage by immunoblotting.

Western blotting

Cells were lysed in RIPA modified buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% DOC, 150 mM NaCl, 20 mM sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail (Roche)). Lysates were vortexed 20 min at 4°C and then cleared by centrifugation at 10, 000 rpm for 15 min at 4°C. Equal amounts of proteins (20 µg determined by micro-BCA kit, Pierce) were loaded and separated by SDS-PAGE. After transfer at 4°C, nitrocellulose membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline, pH 8.0, containing 0.1% Tween 20 (TBST) prior to addition of the corresponding primary antibody and followed with IRDye-coupled secondary antibodies (Rockland) against rabbit or mouse immunoglobulins. For detection of phosphorylated proteins, antigens were detected with phospho-specific antibodies diluted in 5% BSA in TBST at 4°C. Protein bands were identified with Odyssey Imaging System (LI-COR Biosciences). Signals were quantified with LI-COR software. The membranes were reprobed with an anti-β-tubulin, anti-β-actin monoclonal or anti-pan Erk1/2 polyclonal antibodies for normalization.

Immunocytochemistry and TUNEL assay

Cytochrome c release was followed by immunostaining as described previously [37]. Briefly, at the end of the treatment time, cells were washed gently once with PBS followed by fixation in 4% formaldehyde for 15 min. The fixed cells were washed three times with PBS 5 min each, followed by permeabilization in 0.15% Triton X-100 in PBS for 15 min. The cells were then blocked for 60 min in blocking buffer (2% BSA in PBS) followed by 4 hours incubation with a mouse monoclonal antibody against cytochrome c. The cells were washed three times for 10 min each in blocking buffer followed by 1 hour incubation with a rhodamine-labeled goat anti-mouse IgG (1/500, Jackson Immunology). The cells were washed three times for 10 min in PBS, counterstained with 0.5–1 µg/ml DAPI, to examine nuclear morphology and quantify apoptosis. TUNEL assay was performed using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red (Roche Diagnostics) following the manufacturer's protocol. Cells were viewed under a fluorescence microscope (Leica DM6000) and images were captured with a digital camera using Metamorph software. Different fields (at least 200 cells) were counted for each experiment.

Statistical analysis

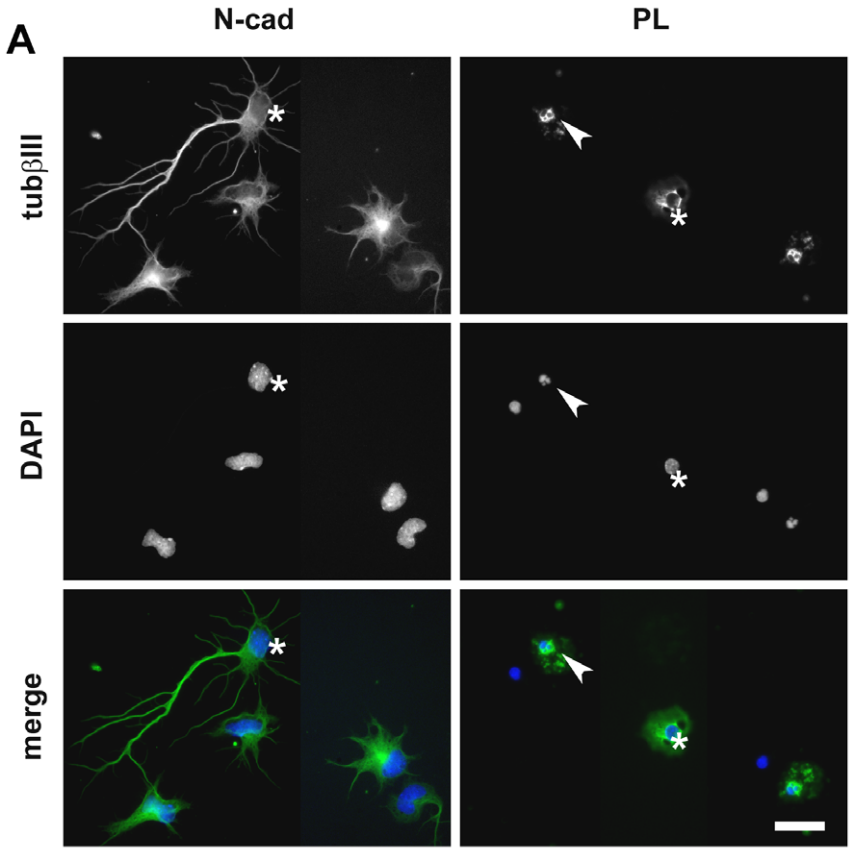
Data were compared by ANOVA followed by protected *t* test for multiple comparisons. Paired sample means were compared using the *t* test. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

N-cadherin engagement promotes survival of primary neurons

In primary neuron culture studies, most culture protocols have been optimized to grow neurons on poly-ornithine (PO) or poly-L-lysine (PL) attachment factors. Associated culture media have been adapted by adding sera and/or B27 supplement. We observed that when these media additives were omitted from E18.5 rat hippocampus neurons cultured on PL, although cells initially bound to the plate, they rapidly died (Fig. S1). In contrast, replacing PL by recombinant Ncad-Fc (N-cad) as a substrate allowed maintaining healthy neurons in culture for at least 24 to 48 hours (Fig. S1). Although cells were seeded in similar conditions for each substratum, the observed reduction in healthy neurons on PL might be due to a deficit in the initial adhesion of these cells on PL. To assess this point, we counted the actual number of cells attached at 1 hour, 4 and 24 hours after seeding, and observed that there was no deficit of cell binding on PL compared to N-cad at early time points (Fig. S2A). This was confirmed by the fact that we were able to observe by time-lapse microscopy that cells initially attach then die (data not shown).

To further characterize the effect of N-cadherin on survival of rat hippocampal neurons in the absence of B27 additive, cultures were fixed after 24 hours and stained for βIII-tubulin to identify neuronal cells. The total number of remaining βIII-tubulin positive cells was dramatically lower on the PL substrate (below 20%) in comparison to the number of cells remaining on the N-cad substrate (Fig. 1A, 2A), confirming that in these basal conditions, N-cad had a survival effect on primary hippocampal neurons. Similar observations were made for primary murine spinal cord cultures (Fig. 1B, 2B). In this case, the difference in the total number of βIII-tubulin positive cells between the PL and N-cad substrate was not as dramatic after 24 hours. However, DAPI staining revealed that the percentage of presumably apoptotic condensed nuclei was higher on PL (54±2% of βIII-tubulin positive cells with condensed nuclei) than on N-cad substrates (25±3% of βIII-tubulin positive cells with condensed nuclei). In addition, when we analyzed cell death by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) we observed that the number of TUNEL positive cells in hippocampal cultures increased with time on PL whereas it remained very low on N-cad (Fig. S2, B). Altogether these observations show that primary


A
N-cad
PL
tubβIII
DAPI
merge

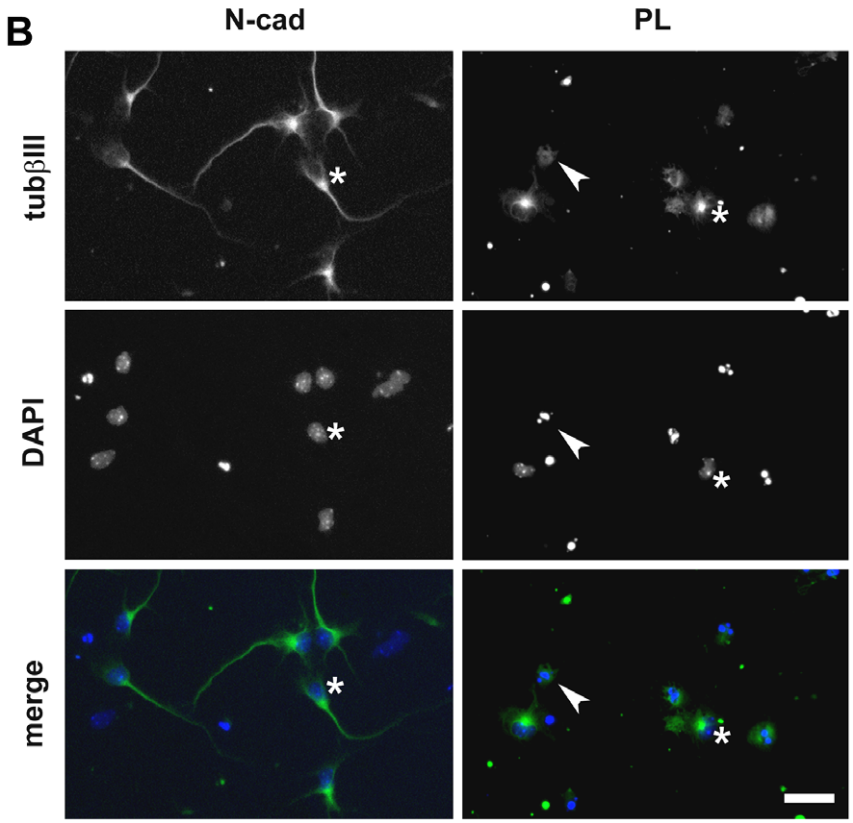

B
N-cad
PL
tubβIII
DAPI
merge

Figure 1. N-cadherin engagement sustains spinal cord and hippocampal neuronal cell survival in minimal medium conditions. Neurons were dissociated from E18.5 rat hippocampus (A) or E12.5 mouse ventral spinal cords (B) and cultured on N-cad or PL in MEM and Neurobasal basal medium, for hippocampal and spinal neurons, respectively. After 24 hours, they were fixed, and stained with anti-βIII tubulin antibody to identify neurons and with DAPI to assess the nuclear morphology. Arrows point toward cells dying with condensed nuclei while asterisks indicate cells with healthy nuclei. Scale bar: 10 μm in A; 20 μm in B.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g001

neurons die, likely by apoptosis, in these stringent conditions when plated on PL, while they displayed a high survival rate when plated on N-cad. They suggest thus that N-cadherin engagement promotes their survival.

N-cadherin engagement protects GT1-7 cells from undergoing apoptosis

However, molecular and biochemical studies on primary culture models are difficult to perform due to the limited amount of biological material. Therefore to study the molecular pathway whereby N-cadherin mediates cell survival, we decided to use GT1-7 immortalized hypothalamic neurons [34], which express N-cadherin. These cells usually grow as confluent layers in serum-supplemented media which provides them cell-cell adhesion as well as diffusive (growth factors) and anchorage-dependent (fibronectin/vitronectin) survival factors.

To investigate the contribution of cadherin-mediated cell-cell adhesion to neuronal cell survival, we forced serum-starved GT1-7 cells to grow in suspension by plating them on agarose-coated dishes, as previously reported [7,8]. We then manipulated extracellular calcium concentrations to allow (1.8 mM Ca^{2+}) or inhibit (0 mM free Ca^{2+}) calcium–dependent cell-cell adhesion. The presence of a physiological concentration of Ca^{2+} induced the expected cell aggregation, while GT1-7 cells only loosely aggregated in the absence of free Ca^{2+} consistent with a massive inhibition of cell-cell adhesion (Fig. 3A). To determine the involvement of calcium-dependent cell adhesion on cell survival, we then analyzed the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) induced in apoptotic cells by activated caspases. The inhibition of calcium-dependent cell-cell adhesion specifically induced the PARP cleavage whereas PARP cleavage remained very low in cells cultured in the presence of calcium (Fig. 3B). These results show that cells forced to grow under serum-free anchorage-independent conditions survive as multicellular aggregates and that Ca^{2+}-dependent cell adhesion sustain cell survival in these conditions, as previously reported in other cellular models [7,8].

Next, we set up more controlled cell culture conditions to investigate specifically the effect of N-cadherin adhesion on cell survival. GT1-7 cells were seeded either on N-cad substrate to specifically engage N-cadherin homophilic liganding or on PL to deprive them of specific adhesion, in (i) serum-free conditions to exclude cell-ECM and growth factors activated signaling, and (ii) at low density to prevent uncontrolled cell-cell contact formation (Fig. S3). In some control experiments, cells were seeded on fibronectin substrate (FN) to allow for controlled integrin mobilization, a situation known to mediate cell survival.

GT1-7 cell death was first evaluated by the nuclear condensation after DNA staining (Fig. 4). 72% of cells seeded on PL were positive for nuclear condensation whereas only 18% of cells seeded on N-cad exhibited condensed nuclei after 24 hours (Fig. 5A). Interestingly, a similar low proportion of condensed nuclei (~20%) was also obtained among cells seeded on fibronectin substrate (FN), where cell-matrix-anchorage was expected to induce an integrin-mediated cell survival pathway. To exclude the possibility that cell survival observed on N-cad was the consequence of integrin engagement induced by the deposition of ECM components by GT1-7 cells themselves, we evaluated integrin pathway activation by phosphorylated FAK and paxillin immunostaining. We did not detect paxillin (Fig. S4) nor phosphorylated forms of FAK (data not shown) accumulation at the ventral face of the cells seeded on PL or N-cad while both stainings were strongly

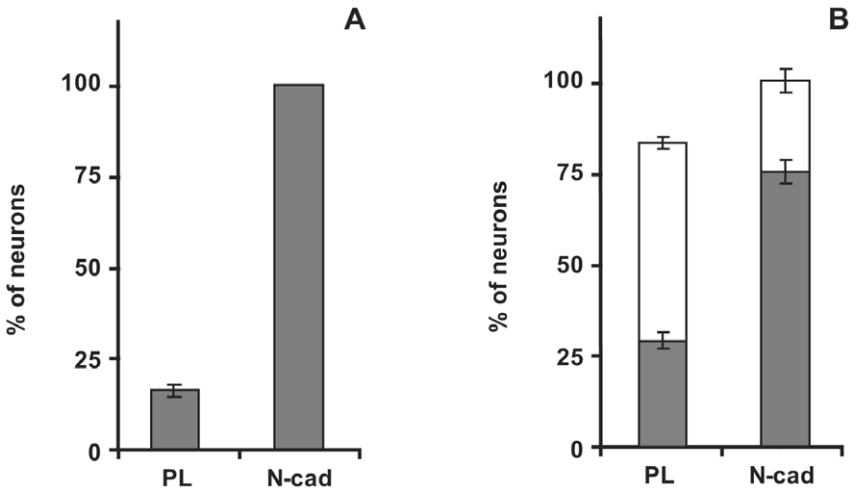


Figure 2. N-cadherin engagement sustains spinal cord and hippocampal neuronal cell survival. (A) In 24 hours hippocampal cultures, the number of βIII tubulin-positive cells per μm^2 were counted on each substrate and expressed as a percentage of that on N-cad substrates, arbitrarily fixed to 100%. (B) The numbers of βIII tubulin-positive cells with condensed (white bars) or non-condensed nuclei (dark bars) were determined in ventral spinal cords cultures after 24 hours on each substrate. The number of βIII tubulin-positive cells per μm^2 was expressed as a percentage of the number of βIII tubulin-positive cells per μm^2 on N-cad substrates, arbitrarily fixed to 100%. Results are expressed as the mean ± SD of two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g002

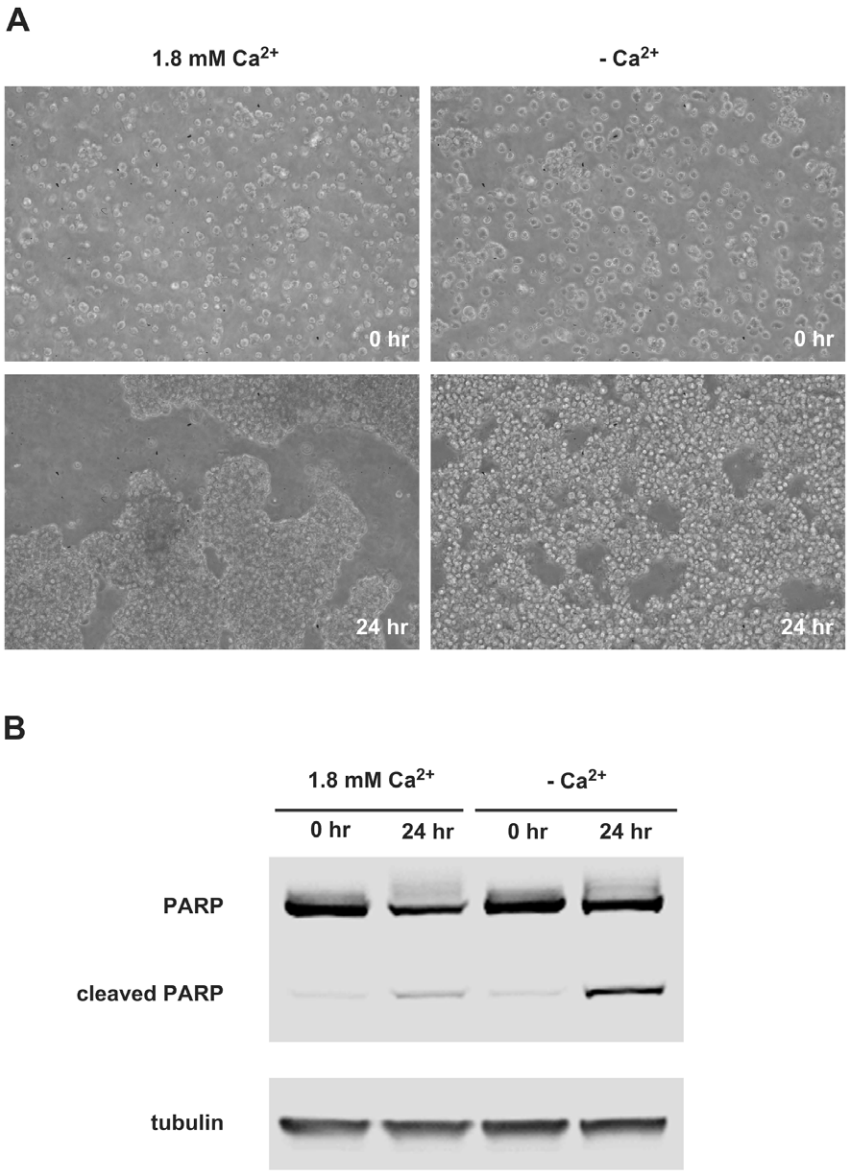


Figure 3. Inhibition of calcium-dependent cell-cell adhesion induces apoptosis of GT1-7 cells in suspension. Serum-starved GT1-7 cells were cultured in suspension in agarose-coated dishes in the presence of calcium (1.8 mM) or without calcium (2.5 mM EDTA). (A) Phase-contrast photomicrographs were taken at time 0 and 24 hr of incubation. (B) Cells lysates were then analyzed by western blotting for PARP cleavage. Western blot representative of two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g003

accumulated at focal adhesions in GT1-7 cells seeded on FN (Fig. S4 and data not shown). To confirm that the survival effect was the result of a specific engagement of N-cadherin, we tested the ability of a dominant negative mutant form of N-cadherin [32] to perturb cell survival triggered by N-cadherin. This DN-Ncad mutant was expressed in GT1-7 cells that were then seeded on N-cad substrate. While most of the control GT1-7 cells transfected with a GFP-encoding plasmid displayed healthy nuclei morphology after 24 hours on the N-cad substrate, more than 50% of the DsRed positive cells displayed condensed nuclei (Fig. S5), indicating that the expression of DN-Ncad counteracts the protective effect of the N-cad substrate. These results suggest that N-cadherin engagement protects cells against apoptosis in a specific manner.

To gain insight on the specific cell death pathway activated, cytochrome c release from mitochondria to the cytosol was evaluated by immunostaining (Fig. 4). After 24 hours, a vast majority of cells (80%) seeded on PL showed a cytochrome c distribution characteristic of cytosolic localization and very often a total loss of cytochrome c, as reported in [38], (Fig. 5B). In contrast, most of the cells seeded on N-cad showed a punctuated or tubular perinuclear pattern characteristic of the mitochondria network and only 22% of the cells had released their cytochrome c out of mitochondria. Similar results were obtained with cells seeded on FN (positive control of cell survival), with less than 20% of cells showing diffuse cytochrome c staining (Fig. 5B). Time course studies showed that nuclear condensation and cytochrome c release were already high 6 hours after plating cells on PL whereas the percentage of apoptotic figures remained low and constant for cells on N-cad (Fig. S6).

To confirm that these cytological changes were part of an ongoing apoptotic process that was repressed by N-cadherin

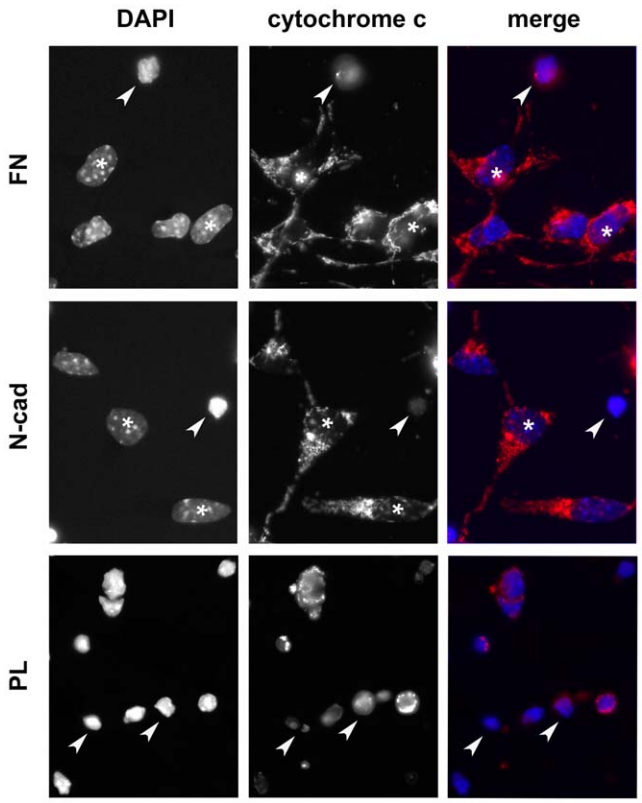


Figure 4. N-cadherin engagement protects neuronal cells from nuclear condensation and cytochrome c release. Serum-starved GT1-7 cells were seeded at low density on FN, N-cad or PL substrates and grown in serum-free medium. After 24 hours, cells were fixed and immunostained for cytochrome c (right) while nuclei were stained with DAPI (left). Arrows point toward cells showing condensed nuclei and diffuse or absence of cytochrome staining while asterisks indicate cells with healthy nuclei and mitochondrial cytochrome staining. Scale bar: 20 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g004

engagement, we analyzed cell death by two complementary approaches: (i) TUNEL staining and (ii) PARP cleavage. After 4 hours of culture, the number of TUNEL positive GT1-7 cells was significantly higher on PL (8.6±0.9%) than on N-cad (2.1±0.6%) indicating that the deprivation of specific cell adhesion (PL substrate) induced apoptotic cell death (Fig. 5C). Moreover, when GT1-7 cells were seeded on PL, PARP cleavage was detected by the appearance of the characteristic 85 kDa fragment. By contrast, cells seeded on N-cad showed a reduced PARP cleavage (Fig. 5D). Altogether, these results indicate that N-cadherin engagement is sufficient to sustain GT1-7 cell survival by protecting them from apoptotic cell death.

PI3-kinase/Akt pathway is not involved in N-cadherin engagement

To elucidate the pathways involved in the protective effects of N-cadherin mobilization, we studied the activation of the PI3-kinase/Akt pathway, a key regulator of cell survival. First, we investigated whether N-cadherin mobilization could activate Akt kinase by phosphorylation on Ser-473. We previously showed that cells require at least 2 hours in order to spread on N-cadherin substrate; therefore, Akt phosphorylation was investigated by western blotting analysis using a phospho-specific antibody starting at 2 hours after plating. As cell death had reached a plateau at 6 hours, phosphorylation studies were conducted up to 6 hours. Spreading of cells on N-cad did not affect Akt phosphorylation at any time point studied (Fig. 6A). To confirm these results, we used a calcium switch approach with GT1-7 grown at confluency. Although less specific than Ncad-Fc mediated engagement, calcium restoration rapidly initiates cadherin-dependent cell-cell contact formation [39] allowing study of earlier time points. However, Akt phosphorylation was not changed even at earlier time points (Fig. 6B), confirming that Akt phosphorylation was not activated by N-cadherin engagement.

Alternatively, Akt could be a direct substrate for caspases. Indeed, it has been shown that Akt is cleaved by caspases leading to a reduction in Akt protein level in MDCK cells detached from the ECM. In turn this cleavage of Akt contributes to anoïkis [40]. To test this hypothesis, we assessed the total amount of Akt at various time points, but cellular levels of total Akt protein were not decreased on PL substrate compared with those on N-cad (Fig. 6C). Altogether, these observations suggest that the PI3-kinase/Akt pathway is not involved in the anti-apoptotic effect of N-cadherin in GT1-7 cells. In addition, the PI3-kinase inhibitor LY294002 had no effect on cell survival, nuclear condensation and TUNEL labeling of cell seeded on N-cad (data not shown). Thus, we investigated the involvement of other pathways, such as MAP kinase signaling, which has been reported to mediate cell survival [10].

MAP kinase Erk signaling is required for cell survival induced by N-cadherin engagement

To examine whether N-cadherin engagement could trigger a signal transduction pathway involving the MAP kinases, we evaluated the phosphorylation state of Erk1 and Erk2 using a phospho-specific antibody. The phosphorylation of Erk1/2 was increased in a time-dependent manner in cells seeded on N-cad substrate as compared to cells seeded on PL. Phosphorylation of Erk1 and Erk2 was maximal at 4 hours with a 2.5 fold increase compared to cells seeded on PL (Fig. 7A). Furthermore, the restoration of intercellular adhesion in the calcium switch assay induced a strong elevation of Erk1 and Erk2 phosphorylation with a 6-fold increase observed at 30 min (Fig. 7B). These results support an activation of the Erk1/2 pathway in response to N-cadherin engagement in accordance with our previous report on the activation of Erk1/2 by N-cadherin engagement in primary spinal cord neurons.

To confirm the involvement of the MAP kinase pathway in relaying the anti-apoptotic signal triggered by N-cadherin engagement, we examined the effect of U0126, a specific inhibitor of the Mek1/2 kinase activity. We used this inhibitor at 20 μM. Indeed this concentration was sufficient to abolish Erk1/2 phosphorylation during the calcium switch (Fig. S7). U0126-treated cells were seeded either on PL or N-cad and apoptotic cells were scored at 6 and 24 hours using nuclear condensation and cytochrome c release markers (Fig. 8). U0126 treatment did not affect cell death on PL. However, this treatment reversed the protective effects of N-cadherin since a similar apoptosis level as for cells seeded on PL was observed on the Ncad substrate (Fig. 8B, C). These results indicate that N-cadherin protection is lost in the presence of Mek1/2 inhibitor and support the hypothesis that the Erk1/2 pathway is involved cell survival downstream of N-cadherin engagement.

N-cadherin engagement does not regulate Bcl-2 or Bad protein levels

We next aimed at determining the downstream targets of the MAP kinases involved in cell survival pathway induced by the N-

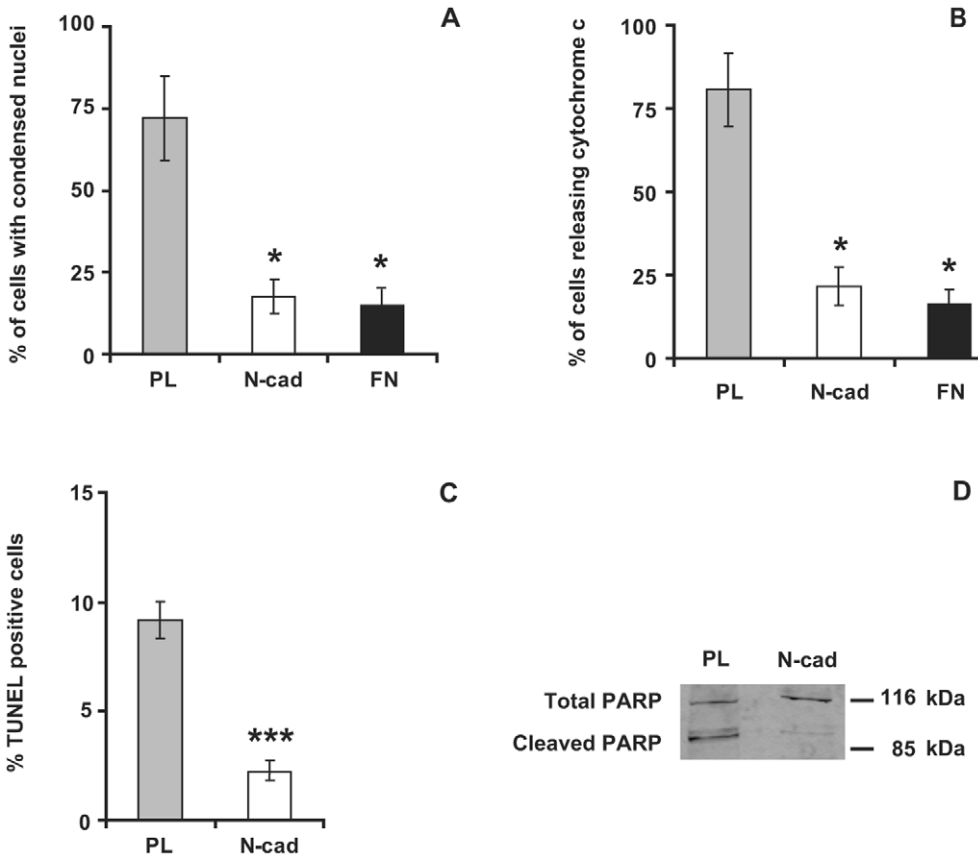


Figure 5. N-cadherin engagement protects neuronal cells from apoptosis. GT1-7 cells were cultured as indicated in Figure S2 for 24 (A, B) or 4 hours (C) and processed for nuclear condensation (A), cytochrome c release (B) as well TUNEL libeling (C). PARP cleavage was analyzed by western blotting of equivalent protein content from cell lysates (D). Results in A, B and C are expressed as the mean ± SD of four independent experiments. Western blotting in D is representative of three independent experiments. Asterisks (*) or (***) indicate a significant difference ($P<0.05$) or ($P<0.01$) respectively as compared with PL.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g005

cadherin engagement. Several studies have reported that, during anoïkis, Bcl-2 family members such as the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins or the pro-apoptotic proteins Bad or Bim are regulated by activated MAP Kinases [10]. Therefore, we measured the Bcl-2 protein levels by immunoblotting at several time points. Bcl-2 protein levels remained constant after N-cadherin engagement and at levels equivalent to those of cells seeded on PL (Fig. 9A). Consistent results were obtained with the calcium switch assay (Fig. 9B), suggesting that cell survival induced by N-cadherin engagement was not mediated by an increase of the anti-apoptotic Bcl-2 protein levels.

It has also been demonstrated that the early phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bad on Ser-112 by MAP kinases leads to its inactivation [41] resulting in cell survival. However, we did not detect any increase of Bad phosphorylation in cells seeded on N-cad at the earlier time point (4 hours) as compared to cells seeded on PL (Fig. 9C). Moreover, calcium restoration in confluent GT1-7 cells did not induce Bad phosphorylation at any time point tested (Fig. 9D). These results indicate that Bcl-2 and Bad proteins take not part in the survival pathway induced by N-cadherin mobilization.

N-cadherin engagement down-regulates the pro-apoptotic protein Bim-EL

The Bim protein is another critical regulator of apoptosis downstream of MAP kinase signaling. We determined whether N-cadherin engagement affects Bim protein levels. In confluent GT1-7 cells, Bim was expressed at low levels and Bim-EL was the only form of Bim detected. However in cells deprived of cell-matrix and cell-cell contacts (PL substrate) Bim-EL was up-regulated, while it remained low in cells seeded on N-cad. At 24 hours Bim-EL protein level was 3.5 fold higher in cells seeded on PL than on cells seeded on N-cad (Fig. 10A), suggesting that N-cadherin engagement might favor cell survival by down-regulating Bim-EL. To ascertain whether Erk1/2 pathway acts downstream of N-cadherin to regulate the level of Bim-EL protein, N-cad seeded cells were treated with 20 μM U0126. This treatment induced a 3 fold increase in Bim-EL levels thereby reaching similar levels to those in cells seeded on PL (Fig. 10A). The increase of this pro-apoptotic protein was consistent with the raise of the apoptotic index in cells seeded on N-cad and treated with U0126 (Fig. 8). Altogether these findings indicate that MAP kinase activation following N-cadherin engagement could sustain GT1-7 cell survival by maintaining Bim-EL protein levels low. Interestingly, we observed that adhesion of GT1-7 cells to the pro-survival FN substrate down-regulates Bim-EL in a similar Erk1/2-dependent manner than N-cadherin (Fig. S8). Luciano et al. showed that phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on Ser-69 triggers its degradation by the proteasome pathway and promotes cell survival [33]. We thus searched for changes in the status of Bim-EL phosphorylation. As a positive control of Bim-EL phosphorylation, cells were treated with PMA. Addition of PMA induced a

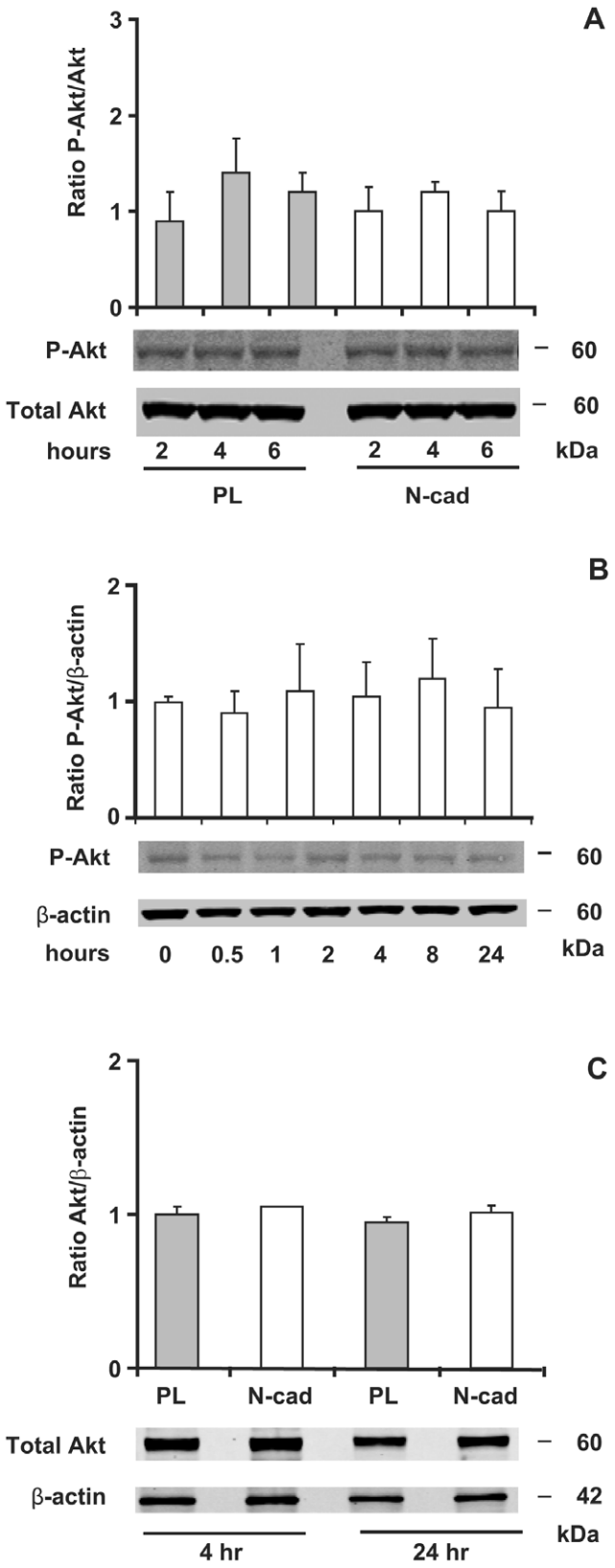


Figure 6. Akt is not involved in N-cadherin-mediated GT1-7 cell survival. Serum-starved cells were seeded at low density on PL or N-cad and grown for the indicated time in serum-free medium (A, C). In (B), confluent cell cultures were subjected to a calcium switch (see "Experimental Procedures"). Equivalent amount of cell lysates was separated on 4–12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and immunobloted with antibodies to phospho-specific Ser473 Akt, total Akt and β-actin. The relative densities of phospho-Akt were normalized to total Akt, and the relatives densities of Akt were normalized to β-actin. Results are expressed as the mean ± SD of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g006

mobility shift of Bim-EL and was correlated with the expected phosphorylation of Erk1/2 (Fig. 10B). This mobility shift of Bim-EL observed in GT1-7 cells was quite similar to the one observed by Luciano et al. in different cell lines and tissues as a result of Bim-EL phosphorylation [33]. At early time points (4 hours), we detected the same mobility shift of the Bim-EL protein in cells spread on N-cad which was abrogated by U0126 treatment (Fig. 10C). These results suggest that upon N-cadherin engagement, Bim-EL is phosphorylated by Erk1/2 kinases.

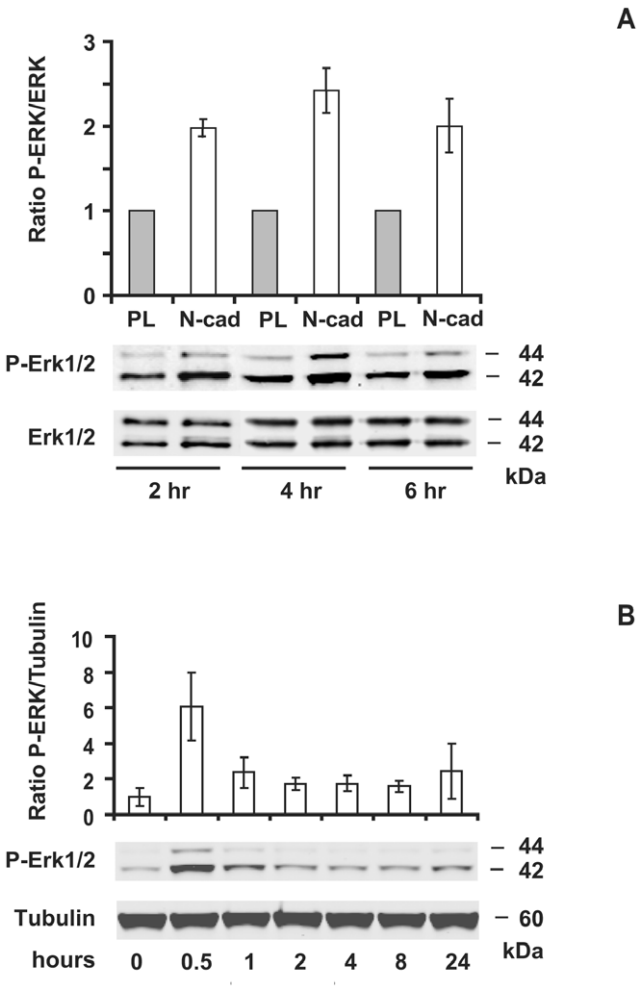


Figure 7. Erk1/2 phosphorylation is up-regulated by N-cadherin engagement. Serum-starved GT1-7 cells were seeded at low density on PL or N-cad and grown for the indicated time in serum-free medium (A); alternatively confluent GT1-7 cell cultures were subjected to a calcium switch (B). Equivalent amount of proteins were blotted onto nitrocellulose membranes that were incubated either with anti-phospho Erk1/2, anti-total Erk1/2, or anti-α-tubulin. The relative densities of phospho-Erk1/2 were normalized to total Erk1/2 (A) or to α-tubulin (B). Histograms present the data of three independent experiments (mean ± SD).
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g007

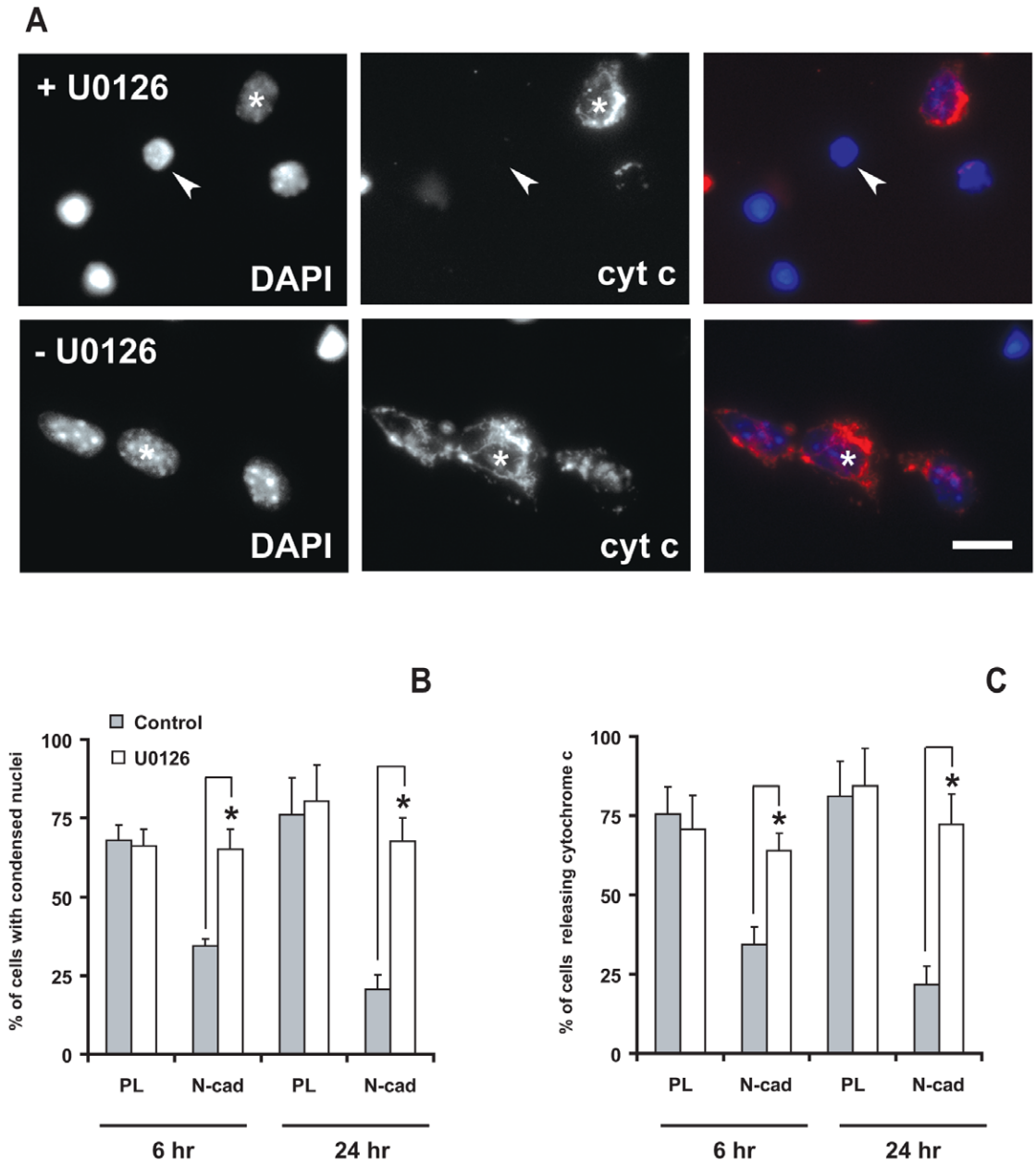


Figure 8. Mek 1/2 inhibitor induces apoptosis on cells seeded on N-cadherin. Serum-starved GT1-7 cells were pretreated with 20 μM U0126 or vehicle for 1 hour, then seeded at medium density on N-cad with or without 20 μM U0126 for 6 hours (A). Apoptosis was evaluated by determination of nuclei condensation following DAPI staining and cytochrome c release following immunostaining. Arrows point toward cells showing condensed nuclei and absence of cytochrome c staining while asterisks indicate a cell with healthy nuclei and cytochrome c staining. Scale bar: 20 μm. (B, C). The percentage of cells with condensed nuclei and diffuse/absent cytochrome c labeling was quantified at 6 and 24 hours in treated and non-treated cells seeded on PL or N-cad. Results are expressed as the mean ± SD of four independent experiments. Asterisks indicate a significant difference ($P<0.05$) as compared with PL.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g008

Overexpression of a S69G phosphorylation defective form of Bim-EL prevents N-cadherin cell survival

In order to test whether the phosphorylation and down-regulation of Bim-EL was involved in mediating N-cadherin engagement-induced cell survival, we looked at the effect of overexpression of an Erk-dependent phosphorylation site defective mutant of Bim-EL (Bim-EL S69G) [33] on the survival of GT1 cells seeded on N-cadherin (Fig. 11). To prevent massive accumulation of the pro-apoptotic protein in cells before their settlement on N-cadherin, Bim-EL expression vector were lipofected 2 hours before plating on the N-cadherin substrate. To identify transfected cells, the Bim-EL vector was lipofected together with a GFP expressing vector. We first assessed the expression of Bim-EL S69G protein in confluent GT1-7 cells 8 hours and 24 hours post-transfection (Fig. 11A). While low levels of endogenous Bim-EL were detected in GFP alone transfected cells, a 2.5 to 3 fold increase in Bim expression was observed in Bim-EL S69G transfected cell cultures, for a percentage of transfected cells around 10% of the cell culture population, indicating that the Bim-EL mutated protein indeed highly accumulates in individual transfected cells.

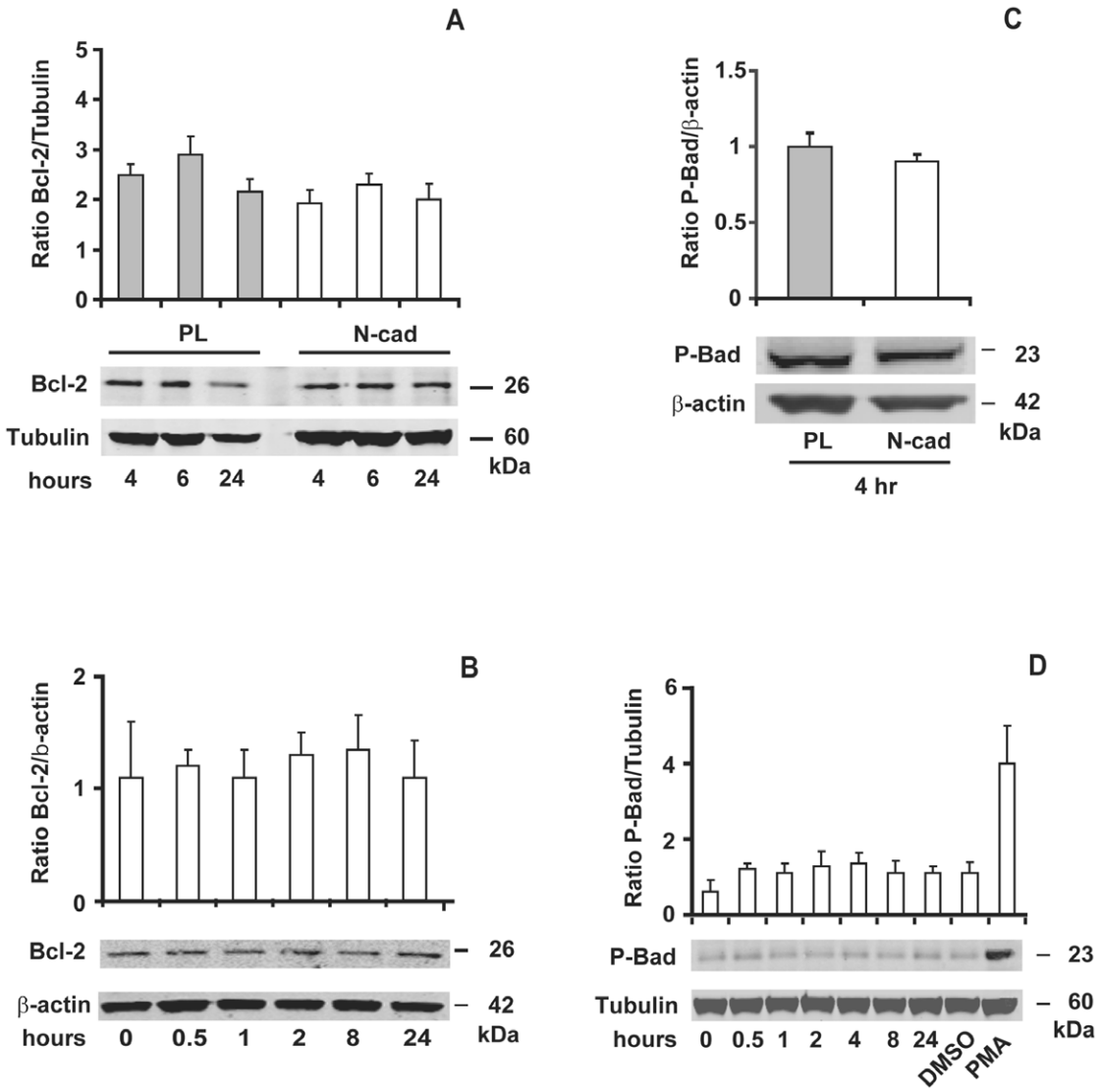


Figure 9. N-cadherin engagement does not affect Bcl-2 protein level and Bad phosphorylation. Serum-starved GT1-7 cells were seeded at low density on PL or N-cad and grown for the indicated time (A) or for 4 hours (C) in serum-free medium. In B-D, cells were subjected to a calcium switch protocol. As a positive control, cells were treated with 10 ng/ml of PMA or DMSO for 1 hour. Equivalent amount of proteins were immunobloted with antibodies to Bcl-2 and phospho-Bad. Relative densities of Bcl-2 and phospho-Bad were normalized with either α-tubulin, or β-actin. Results are the mean ± SD of three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g009

We then analyzed the effect of Bim-EL S69G overexpression on the survival of cells seeded on N-cadherin by determining the percentage of transfected cells with a condensed nucleus 6 hours and 24 hours after plating (Fig. 11B). The expression of GFP alone did not lead to an increase in the occurrence of dying cells compared to un-transfected cells plated on N-cadherin (compare with Figure 5). In contrast, the overexpression of Bim-EL S69G induced a significant increase in the number of apoptotic cells both at 6 and 24 hours. The overexpression of the wild type form of Bim-EL expressed at similar levels (Fig. 11A) had no significant effect on GT1-7 cells plated on N-cadherin at 6 hours, although it impaired the survival at 24 hours (Fig. 11B), suggesting that the accumulation with time of wild time Bim-EL may also lead to apoptosis due to the overwhelming of the Bim-EL phosphorylation and degradation pathway. Altogether, these data indicate that the accumulation of Bim-EL and in particular of its Erk- phosphorylation defective mutant (S69G) prevents N-cadherin-induced cell survival, supporting the hypothesis that N-cadherin triggers neuronal cell survival through a Bim-EL down-regulation.

Discussion

In this study, we accumulate convergent arguments to support the hypothesis that N-cadherin engagement provides neuronal cells with a pro-survival signal. We cannot formally exclude the contribution of other factors or adhesion molecules to this process. However, the anti-apoptotic effect of N-cadherin engagement was observed in tightly controlled conditions, that is in isolated cells, in the absence of growth factors, and in the absence of detectable integrin activation in focal adhesion complexes. Furthermore the survival effect of the N-cad substrate was alleviated by the expression of a dominant negative form of N-cadherin. These results strongly support the hypothesis that N-cadherin initiates an anti-apoptotic pathway in neurons and neuronal cells that is

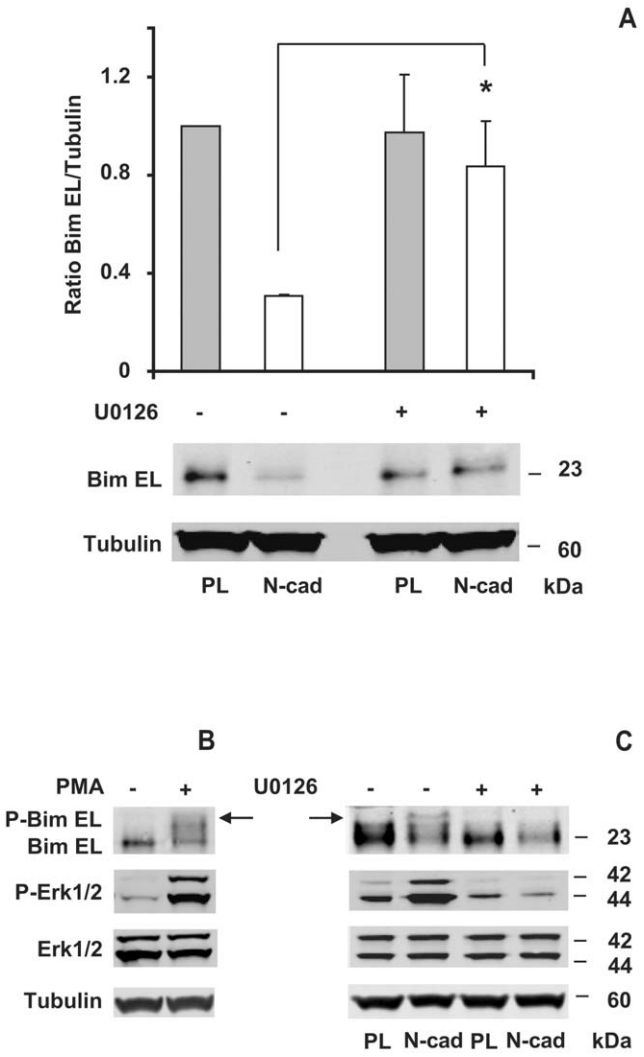


Figure 10. N-cadherin engagement down-regulates Bim-EL protein levels in a Mek1/2 dependent manner. Serum-starved cells were seeded at medium density on PL or N-cad and incubated with or without 20 μM U0126 for 24 hours (A) or 4 hours (C), then protein were extracted and analyzed by western blotting with either anti-Bim, anti-phospho-Erk1/2, anti-Erk1/2, or anti α-tubulin antibodies. Relative densities of Bim-EL were normalized to α-tubulin. As a positive control of Bim-EL mobility shift, adherent cells were treated with 10 ng/ml of PMA for 1 hour (B). Represented data are the mean of three independent experiments. Asterisks indicate a significant difference ($P<0.05$) as compared with no treatment. Arrows show Bim-EL mobility shift.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g010

sufficient to sustain cell survival when they are deprived of other survival factors such as integrin interactions with the ECM. We further report that N-cadherin engagement mediates cell survival by enhancing the Erk1/2 kinase pathway and down-regulating the pro-apoptotic protein Bim-EL (Fig. 12). Bim-EL has been extensively involved in apoptotic pathways in neurons upon NGF deprivation or after K^+ withdrawal [16]. Thus, we propose that N-cadherin engagement may antagonize a common apoptotic pathway activated in neurons upon various stress conditions.

The involvement of cadherins in cell survival has been described previously in different cell types either normal or tumoral [3,7,42,43,44]. However, the molecular mechanism whereby cadherin adhesion contributes to cell survival is still poorly understood and controversial. N-cadherin engagement has been shown to promote survival through the activation of the PI3-kinase/Akt and subsequent phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bad in metastatic cancer cells [7] and in vein smooth muscle cells [45]. The PI3-kinase pathway has also been implicated in E-cadherin-mediated cell survival in Ewing Tumor cells [8] and in epithelial cells [4,5]. Therefore, we examined the role of PI3-kinase/Akt pathway. N-cadherin ligation did not affect Akt and Bad phosphorylation. This was observed at different time points from 30 min to 24 hours and using two different approaches, calcium switch assay and biomimetic substrates. In addition, the inhibitor of PI3-kinase, LY294002, did not block the GT1-7 cell survival after N-cadherin engagement. In agreement with our results, Skaper et al. showed that the inhibition of PI3-kinase/Akt pathway failed to block the survival of hippocampal and cerebellar granule neurons induced by N-cadherin agonist [46]. N- and E-cadherin engagements have been shown to up-regulate Bcl-2 protein [7,8,42]. However, in our model, the levels of Bcl-2 protein were not affected by N-cadherin engagement. These results suggest that signaling pathways that affect cell survival in response to N-cadherin engagement in neuronal cells are independent of the PI3-kinase and Bcl-2 proteins and may involve alternative pathways such as MAP kinases.

Among the MAP kinases, Erk1 and 2 have been widely associated with neuronal cell survival, while JNK and p38 are often implicated in cell death [47]. Several studies suggest that Erk1/2 mediates neuroprotective activity of extracellular factors such as integrins and neurotrophins, as well as during survival of damaged neurons [5,48]. We show that N-cadherin adhesion induces an increase of Erk1/2 phosphorylation and a subsequent inhibition of GT1-7 cell death. Pharmacological inhibition of the MAP kinase pathway using U0126 resulted in the inhibition of Erk1/2 phosphorylation and an increased number of apoptotic cells on N-cadherin. Therefore our results suggest that N-cadherin protects neurons against cell death by activating specifically Erk1/2. Similar observations were reported in ovarian carcinoma cells [49] and in epithelial cells [50] where E-cadherin engagement activates the Ras/Erk1/2 cascade but not the PI3-kinase/Akt pathway.

One critical regulator of apoptosis and target of the MAP kinase pathway is the pro-apoptotic protein Bim. The regulation of Bim activity is complex, involving both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Bim is normally expressed at low levels, and its pro-apoptotic activity kept in check by rapid phosphorylation by Erk1/2 resulting in its ubiquitination and proteosomal degradation. Reginato et al. have shown that attached MCF-10A cells contain low levels of Bim-EL and undetectable levels of Bim-L and Bim-S. All three isoforms were highly up-regulated after cell detachment from the ECM [14]. Fukazawa et al. reported that Bim-EL is the only form expressed in human HBC4 and MDA-MB231 cancer cell lines [51]. They showed that treatment with MAP Kinase inhibitors, which prone cells for apoptosis in the absence of cell anchorage, induced a reduction of Bim-EL phosphorylation together with an increase of Bim-EL protein levels. Similarly, we found that Bim-EL was the only form of Bim expressed, albeit at low level, in GT1-7 cells. Upon cell deprivation in cell-matrix and cell-cell contacts (PL substrate) Bim-EL was up-regulated. Conversely, N-cadherin engagement down-regulated Bim-EL protein levels in association with its phosphorylation as revealed by mobility shift [33]. Moreover, the Mek1/2 inhibitor U0126 prevented this phosphorylation, indicating that Bim-EL undergoes Erk1/2 dependent phosphorylation upon N-cadherin engagement, which may be responsible for its down-regulation. Interestingly, plating GT1-7 cells on fibronectin also elicited the

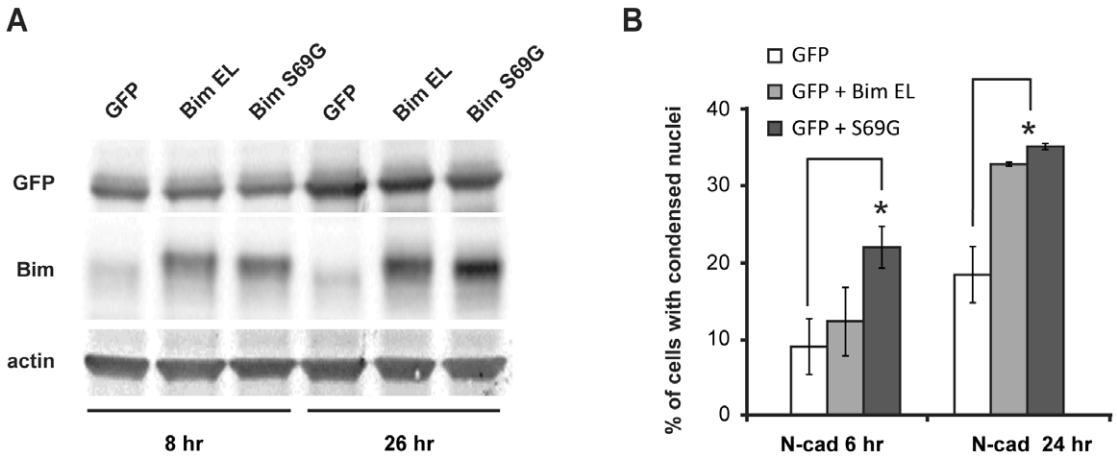


Figure 11. Overexpression of Bim-EL S69G prevents N-cadherin induced cell survival. Expression vectors coding for wild type Bim-EL and Bim-EL S69G were lipofected in 24 hours starved GT1-7 cells together with pEGFP at a 2/1 ratio. Cell lysates of equivalent protein content were analyzed by western blotting at 8 hours and 26 hours post-transfection for Bim and GFP expression; actin was analyzed as loading control (A). Two hours after lipofection, cells were harvested from transfected cultures and seeded on N-cadherin. Preparations were fixed 6 hours and 24 hours later (corresponding to 8 hours and 26 hours post-transfection) and nuclei stained. The percentage of GFP positive cells with condensed nuclei was then determined for each condition in duplicates ($\geq$100 GFP^+ cells counted each time). Represented data are the mean of two independent experiments. Asterisks indicate a significant difference ($P<0.05$) as compared with GFP expression alone.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g011

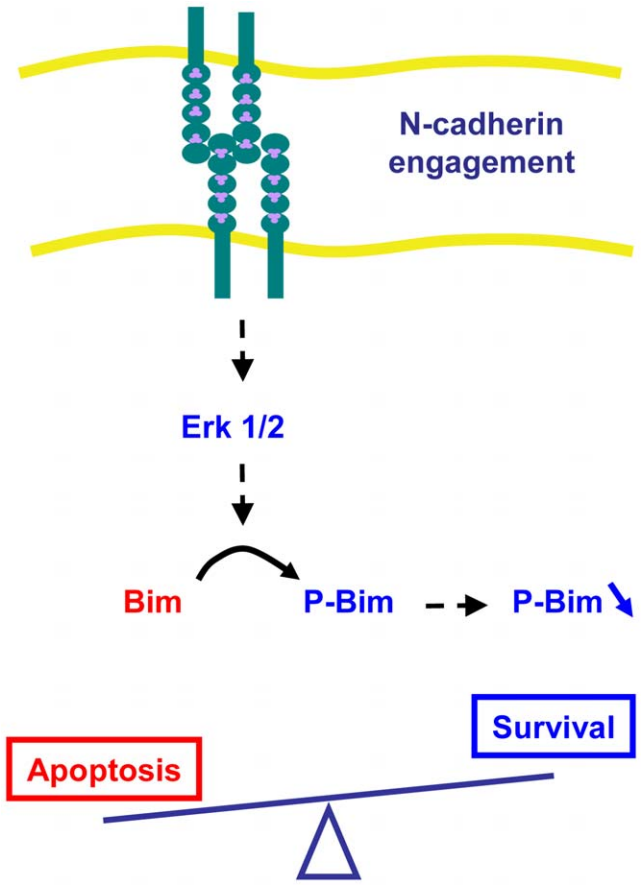


Figure 12. Hypothetical model for N-cadherin mediated cell survival signaling in neurons.
doi:10.1371/journal.pone.0033206.g012

down-regulation of Bim-EL, suggesting that integrin-mediated inhibition of anoikis may similarly rely, to some extent, on a Bim-EL down-regulation in neuronal cells as previously described in MCF-10A cells [14].

The MAP kinase pathway has been implicated in the regulation of Bim-EL expression in various other cell types like hematopoietic cells [52], fibroblasts [53], epithelial cells [14] and neurons [54]. Studies in PC12 neural cells have shown that NGF protects neurons against apoptosis by acute Mek1/2-dependent phosphorylation of Bim-EL and subsequent down-regulation of this specific isoform [54]. In epithelial [14] and cancer cells lines [51], inhibition of the MAP Kinase pathway was also reported to abolish Bim-EL phosphorylation and upregulate Bim protein levels in association with anoïkis. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on Ser-69 has been reported to promote its degradation via the proteasome pathway [33,55,56,57]. However, in our model, we were not able to detect an accumulation of Bim-EL upon treatment with proteasome inhibitors, neither we were able to detect Bim-EL ubiquitination (data not shown). Recently, an alternative mechanism was proposed by Ewings et al [58]. Erk1/2-dependent phosphorylation of Bim-EL promotes its rapid dissociation from Bcl-xL and Mcl-1 proteins and this dissociation may contribute to Bim-EL degradation [58]. Therefore, it remains to elucidate whether, in neuronal cells, Bim-EL phosphorylation drives its subsequent degradation and by which mechanisms. Nevertheless, in support to en essential role of Erk-dependent Bim-EL phosphorylation in triggering N-cadherin engagement-mediated neuronal cell survival, we observed an increased apoptosis on N-cadherin of cells overexpressing Bim-EL S69G. Interestingly, the overexpression of the wild type form of Bim-EL also impaired with a delay the survival of GT1-7 cells plated on N-cadherin. Altogether, these data indicate that the accumulation of Bim-EL prevents N-cadherin-induced cell survival, supporting the hypothesis that N-cadherin triggers neuronal cell survival through Bim-EL down-regulation.

It has long been recognized that cadherin function in close cooperation with, and organize, the cytoskeleton (for review: [1]). In turn, cytoskeleton and in particular microtubules may serve as

scaffolds for signaling molecules that regulate apoptosis, such as Bim. It has been reported that Bim binds to the dynein light chain LC8 and is sequestered to the microtubule-associated dynein motor complex. Under apoptotic stimuli, Bim may be released and neutralizes Bcl-2 proteins [59]. A potential link between cadherins and microtubules has been postulated (for review: [60]). Therefore, it will be interesting to study if N-cadherin engagement affects Bim association with microtubules and whether this process is affected by Mek1/2-dependent Bim phosphorylation, although the quality of the available immunological reagents did not allowed us to test this hypothesis.

In conclusion, this study proposes a novel role of cell-cell contacts mediated by N-cadherin in signaling neuronal survival and provides insight into the underlying molecular mechanisms. It identifies MAP kinase activation and subsequent down-regulation of the pro-apoptotic protein Bim as a major signaling pathway in this process. To our knowledge, this is the first report that N-cadherin engagement mediates neuronal cell survival. The fact the GT1-7 cells response to cadherin engagement is shared with embryonic spinal cord and hippocampal neurons strongly support the hypothesis that promotion of neuronal survival by N-cadherin engagement is a largely spread regulation process. We cannot presently assign the relative contribution of this cell-cell contact signaling and the well-known contribution of cell-matrix adhesion and growth factors signaling in neuronal cell survival. However N-cadherin is a major mediator of cell-cell interactions during the development of the nervous system. Thus, our observations should have potential relevance for the control of the survival/death balance of neurons throughout development and plasticity of the mammalian nervous system.

Supporting Information

Figure S1 Culture of primary neurons in serum free non supplemented medium affects cell survival. E18.5 rat hippocampus neurons were cultured in MEM medium in the presence of B27 additive and serum (+B27) either on PL (poly-L-lysine) or N-cad (immobilized Ncad-Fc). Alternatively they were cultured on the same types of substrate but in the absence of serum and B27 (−B27). After 24 hours, cells were fixed and stained with anti-βIII tubulin antibody to identify neurons. Although neurons grew well on PL as well as on N-cad in the presence of B27, they died on PL in the absence of the additive and serum. In addition, neurite extension was greatly increased on N-cad compared to PL even in the presence of B27 as expected from previous reports. Similar observations were made with cells cultured from 12.5 mouse ventral spinal cords (not shown). Scale bar: 20 μm.
(TIF)

Figure S2 Compared adhesion/survival of primary hippocampal neurons on PL versus Ncad-Fc substrates. E18.5 rat hippocampus neurons were cultured in MEM medium either on PL or N-cad in the absence of serum and B27 additive as reported in Figure 1A. Cultures were fixed at 1, 4 and 24 hours post-seeding and adherent cells were counted (A). Alternatively, preparations were processed for TUNEL labeling and the percentage of TUNEL positive cells determined (B).
(TIF)

Figure S3 Experimental set up for controlled N-cadherin engagement. In regular cell culture conditions (upper left), cells adhere to the substratum via adsorbed fibronectin (FN) and vitronectin (VN) provided by the serum (cell matrix adhesion) and adhere to each other via cadherins and other cell adhesion molecules (CAMs, cell-cell adhesion). To specifically activate either N-cadherin or fibronectin, GT1-7 cells were plated at low density on N-cad or FN, respectively. To deprive cells of specific cell adhesion, they were seeded on PL which mediates electrostatic cell-surface adhesion.
(TIF)

Figure S4 Spreading of cells on N-cad does not mobilize the integrin pathway. GT1-7 cells were cultured on N-cad for 4 hours, then fixed and fluorescently stained for F-actin with phalloïdin (red) and with anti-paxillin antibodies (green). Paxillin staining remained diffuse in the cytoplasm of these cells indicating that integrins were not mobilized on this substrate. In contrast, when GT1-7 cells were cultured on fibronectin (FN) for 4 hours, they displayed expected stress fibers and focal adhesions in which both stainings were strongly accumulated, indicated that indeed integrins have been mobilized and activated in focal adhesions in these culture conditions. Scale bars: 20 μm.
(TIF)

Figure S5 Overexpression of a dominant negative form of N-cadherin drastically impairs the protective effect of N-cad on GT1-7 cells. GT1-7 cells were lipofected with either a dominant negative form of N-cadherin fused to DsRed (DN-Ncad), or GFP alone, starved for 24 hours, then spread on the N-cad substrate. After 24 hours, cells were fixed and processed for nuclei staining. The percentage of transfected cells with normal and condensed nuclei was determined for each condition in three independent experiments and given as mean ± SD.
(TIF)

Figure S6 Time course of GT1-7 cell death. Serum-starved cells were seeded at low density on PL or N-cad and grown for the indicated time in serum-free medium. Cell death was measured by nuclear condensation (**A**) and cytochrome c release (**B**). Asterisks indicate a significant difference ($P<0.05$) as compared with PL.
(TIF)

Figure S7 Dose dependent action of U0126 inhibitor. Serum starved GT1-7 cells were treated (I) or not (C) with the U0126 inhibitor. Cultures were then subject to the calcium switch protocol and harvested just after (0′) or 30 minutes (30′) after calcium restoration. Proteins were extracted and analyzed for P-Erk1/2 content by western blotting. The results of two independent experiments are shown. The tubulin content in the extracts was used as a gel loading control.
(TIF)

Figure S8 Spreading of GT1-7 cells on fibronectin also down-regulates Bim-EL protein levels. Serum-starved cells were seeded at medium density on PL or FN and incubated with or without 20 μM U0126 for 24 hours. Equal amount of proteins were immunoblotted with either anti-Bim or anti-α-tubulin antibodies. Relative densities of Bim-EL were normalized to α-tubulin.
(TIF)

Acknowledgments

We thank Dr S. El Bawab, Dr H. Enslen and Dr A. Sobel for their critical reading of the manuscript, and Thibault Deville for technical assistance. We thank O. Thoumine and F. Luciano for providing the DN N-cadherin and mutant Bim-EL expression vectors, respectively. We would like to thank Mireille Lambert and other members of the team for fruitful discussions during the initial phase of this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RMM HB. Performed the experiments: EL CP CB EW RMM HB. Analyzed the data: EL CP CB RMM HB. Wrote the paper: EL RMM HB.

References

1. Mege RM, Gavard J, Lambert M (2006) Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol 18: 541–548.
2. Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 1: 91–100.
3. Hermiston ML, Gordon JI (1995) In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. J Cell Biol 129: 489–506.
4. Bergin E, Levine JS, Koh JS, Lieberthal W (2000) Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. Am J Physiol Renal Physiol 278: F758–768.
5. Hofmann C, Obermeier F, Artinger M, Hausmann M, Falk W, et al. (2007) Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. Gastroenterology 132: 587–600.
6. Kantak SS, Kramer RH (1998) E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. J Biol Chem 273: 16953–16961.
7. Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL (2002) Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. J Biol Chem 277: 32905–32914.
8. Kang HG, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, et al. (2007) E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. Cancer Res 67: 3094–3105.
9. Wang L, Li Z, Wang C, Yang Y, Sun L, et al. (2009) E-cadherin decreased human breast cancer cells sensitivity to staurosporine by up-regulating Bcl-2 expression. Arch Biochem Biophys. pp 116–122.
10. Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis–Anoikis". Apoptosis 7: 247–260.
11. Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer 2: 647–656.
12. Puthalakath H, Strasser A (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. Cell Death Differ 9: 505–512.
13. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, et al. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. Embo J 17: 384–395.
14. Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, et al. (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. Nat Cell Biol 5: 733–740.
15. Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. Neuron 29: 629–643.
16. Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, et al. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. Neuron 29: 615–628.
17. Doonan F, Donovan M, Gomez-Vicente V, Bouillet P, Cotter TG (2007) Bim expression indicates the pathway to retinal cell death in development and degeneration. J Neurosci 27: 10887–10894.
18. Takeichi M, Matsunami H, Inoue T, Kimura Y, Suzuki S, et al. (1997) Roles of cadherins in patterning of the developing brain. Dev Neurosci 19: 86–87.
19. Redies C, Treubert-Zimmermann U, Luo J (2003) Cadherins as regulators for the emergence of neural nets from embryonic divisions. J Physiol Paris 97: 5–15.
20. Kadowaki M, Nakamura S, Machon O, Krauss S, Radice GL, et al. (2007) N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. Dev Biol 304: 22–33.
21. Takeichi M (2007) The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. Nat Rev Neurosci 8: 11–20.
22. Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. J Cell Biol 135: 767–779.
23. Benson DL, Colman DR, Huntley GW (2001) Molecules, maps and synapse specificity. Nat Rev Neurosci 2: 899–909.
24. Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. Trends Cell Biol 10: 473–482.
25. Benson DL, Tanaka H (1998) N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. J Neurosci 18: 6892–6904.
26. Gavard J, Lambert M, Grosheva I, Marthiens V, Irinopoulou T, et al. (2004) Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. J Cell Sci 117: 257–270.
27. Lambert M, Padilla F, Mege RM (2000) Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. J Cell Sci 113(Pt 12): 2207–2219.
28. Gavard J, Marthiens V, Monnet C, Lambert M, Mege RM (2004) N-cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation: involvement of p120 and beta-catenin. J Biol Chem 279: 36795–36802.
29. Boscher C, Mege RM (2008) Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. Cell Signal 20: 1061–1072.
30. Thoumine O, Lambert M, Mege RM, Choquet D (2006) Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. Mol Biol Cell 17: 862–875.
31. Riehl R, Johnson K, Bradley R, Grunwald GB, Cornel E, et al. (1996) Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. Neuron 17: 837–848.
32. Bard L, Boscher C, Lambert M, Mege RM, Choquet D, et al. (2008) A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. J Neurosci 28: 5879–5890.
33. Luciano F, Jacquel A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, et al. (2003) Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. Oncogene 22: 6785–6793.
34. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, et al. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. Neuron 5: 1–10.
35. Marthiens V, Padilla F, Lambert M, Mege RM (2002) Complementary expression and regulation of cadherins 6 and 11 during specific steps of motoneuron differentiation. Mol Cell Neurosci 20: 458–475.
36. Poulain FE, Sobel A (2007) The "SCG10-LIke Protein" SCLIP is a novel regulator of axonal branching in hippocampal neurons, unlike SCG10. Mol Cell Neurosci 34: 137–146.
37. Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. Faseb J 15: 2669–2679.
38. Gavalda N, Perez-Navarro E, Garcia-Martinez JM, Marco S, Benito A, et al. (2008) Bax deficiency promotes an up-regulation of Bim(EL) and Bak during striatal and cortical postnatal development, and after excitotoxic injury. Mol Cell Neurosci 37: 663–672.
39. Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J Cell Biol 107: 1575–1587.
40. Bachelder RE, Wendt MA, Fujita N, Tsuruo T, Mercurio AM (2001) The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. J Biol Chem 276: 34702–34707.
41. Scheid MP, Schubert KM, Duronio V (1999) Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. J Biol Chem 274: 31108–31113.
42. Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, et al. (2004) Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. J Biol Chem 279: 43061–43069.
43. Peluso JJ, Pappalardo A, Trolice MP (1996) N-cadherin-mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in a progesterone-independent manner. Endocrinology 137: 1196–1203.
44. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Krestow JK, Florenes VA, et al. (1999) Collateral expression of proangiogenic and tumorigenic properties in intestinal epithelial cell variants selected for resistance to anoikis. Neoplasia 1: 23–30.
45. Koutsouki E, Beeching CA, Slater SC, Blaschuk OW, Sala-Newby GB, et al. (2005) N-cadherin-dependent cell-cell contacts promote human saphenous vein smooth muscle cell survival. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 982–988.
46. Skaper SD, Facci L, Williams G, Williams EJ, Walsh FS, et al. (2004) A dimeric version of the short N-cadherin binding motif HAVDI promotes neuronal cell survival by activating an N-cadherin/fibroblast growth factor receptor signalling cascade. Mol Cell Neurosci 26: 17–23.
47. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410: 37–40.
48. Martin SS, Vuori K (2004) Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. Biochim Biophys Acta 1692: 145–157.
49. Shen X, Kramer RH (2004) Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. Am J Pathol 165: 1315–1329.
50. McFall A, Ulku A, Lambert QT, Kusa A, Rogers-Graham K, et al. (2001) Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. Mol Cell Biol 21: 5488–5499.
51. Fukazawa H, Noguchi K, Masumi A, Murakami Y, Uehara Y (2004) BimEL is an important determinant for induction of anoikis sensitivity by mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitors. Mol Cancer Ther 3: 1281–1288.
52. Shinjyo T, Kuribara R, Inukai T, Hosoi H, Kinoshita T, et al. (2001) Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. Mol Cell Biol 21: 854–864.
53. Weston CR, Balmanno K, Chalmers C, Hadfield K, Molton SA, et al. (2003) Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. Oncogene 22: 1281–1293.
54. Biswas SC, Greene LA (2002) Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation. J Biol Chem 277: 49511–49516.
55. Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. J Biol Chem 278: 18811–18816.

56. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Howes E, Balmanno K, et al. (2004) Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. J Biol Chem 279: 8837–8847.
57. Marani M, Hancock D, Lopes R, Tenev T, Downward J, et al. (2004) Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. Oncogene 23: 2431–2441.
58. Ewings KE, Hadfield-Moorhouse K, Wiggins CM, Wickenden JA, Balmanno K, et al. (2007) ERK1/2-dependent phosphorylation of BimEL promotes its rapid dissociation from Mcl-1 and Bcl-xL. Embo J 26: 2856–2867.
59. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell 3: 287–296.
60. Stehbens SJ, Akhmanova A, Yap AS (2009) Microtubules and cadherins: a neglected partnership. Front Biosci 14: 3159–3167.

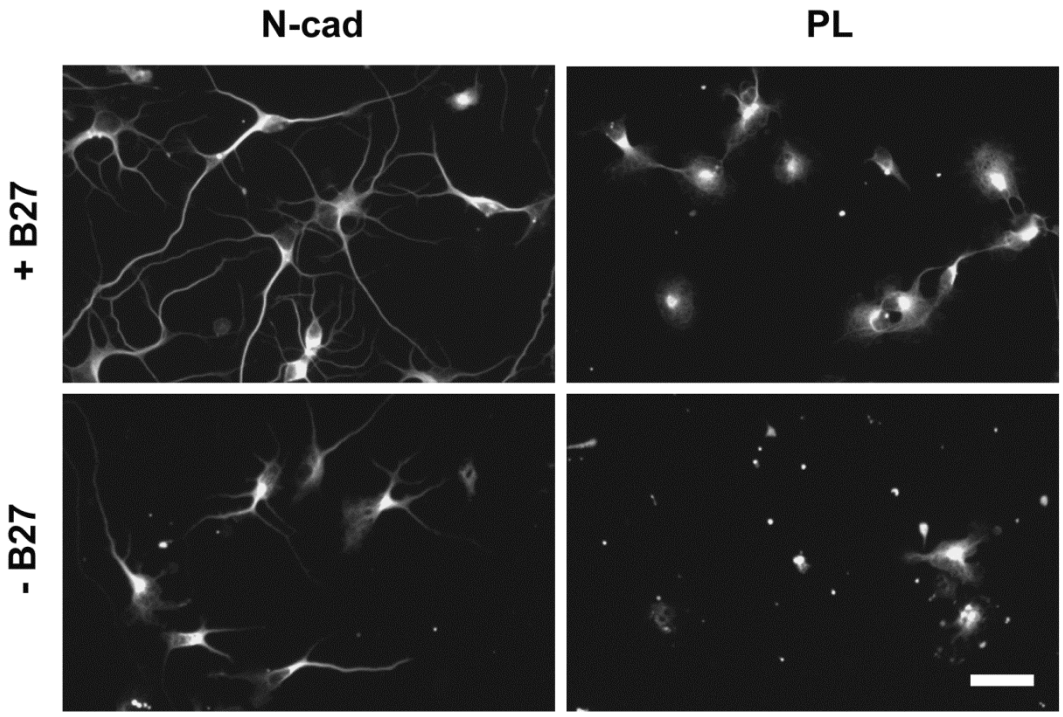


Figure S1.

Culture of primary neurons in serum free non supplemented medium affects cell survival. E18.5 rat hippocampus neurons were cultured in MEM medium in the presence of B27 additive and serum (+B27) either on PL (poly-L-lysine) or N-cad (immobilized Ncad-Fc). Alternatively they were cultured on the same types of substrate but in the absence of serum and B27 (−B27). After 24 hours, cells were fixed and stained with anti-βIII tubulin antibody to identify neurons. Although neurons grew well on PL as well as on N-cad in the presence of B27, they died on PL in the absence of the additive and serum. In addition, neurite extension was greatly increased on N-cad compared to PL even in the presence of B27 as expected from previous reports. Similar observations were made with cells cultured from 12.5 mouse ventral spinal cords (not shown). Scale bar: 20 µm.

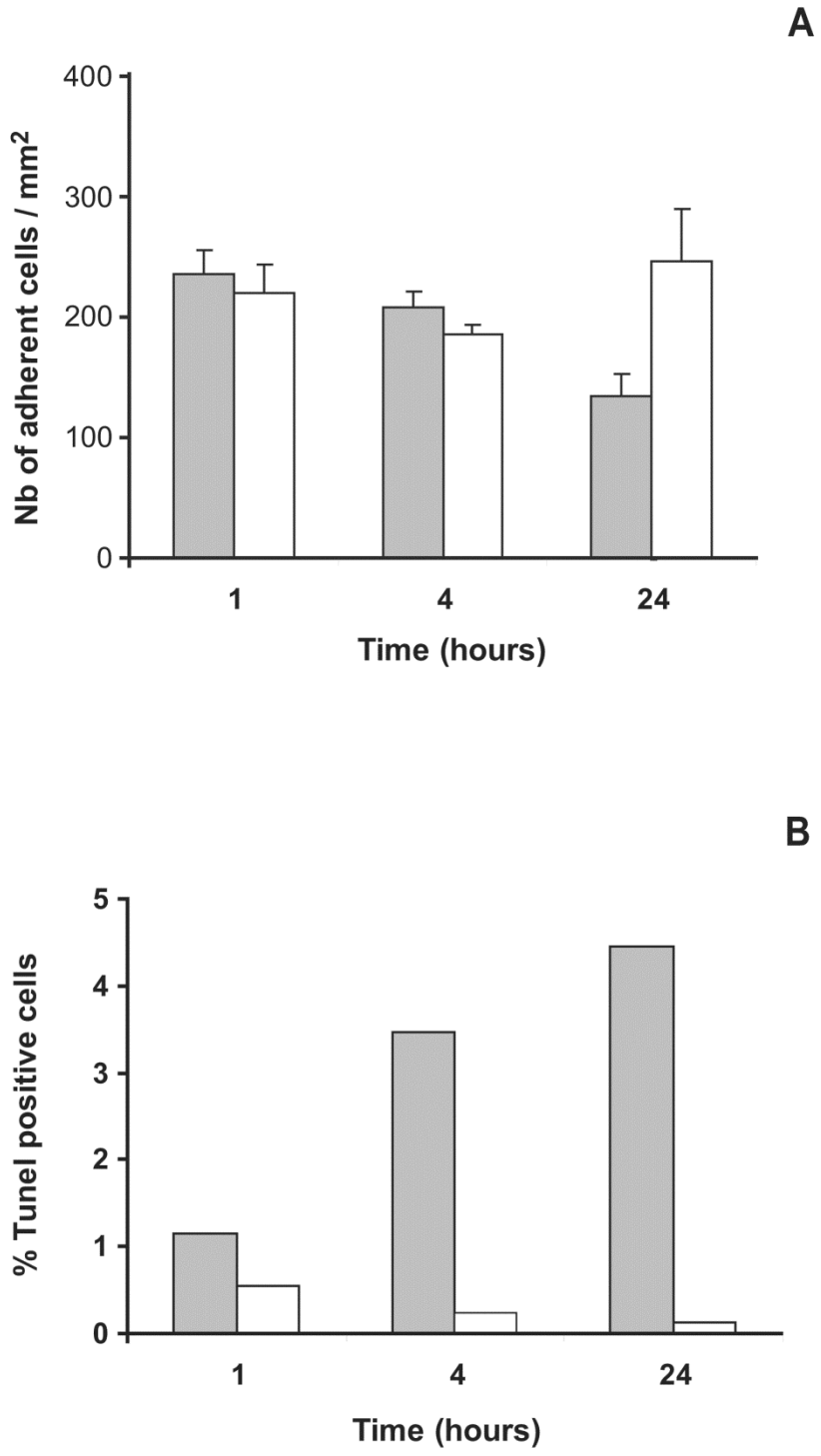


Figure S2.

Compared adhesion/survival of primary hippocampal neurons on PL versus Ncad-Fc substrates. E18.5 rat hippocampus neurons were cultured in MEM medium either on PL or N-cad in the absence of serum and B27 additive as reported in Figure 1A. Cultures were fixed at 1, 4 and 24 hours post-seeding and adherent cells were counted (A). Alternatively, preparations were processed for TUNEL labeling and the percentage of TUNEL positive cells determined (B).

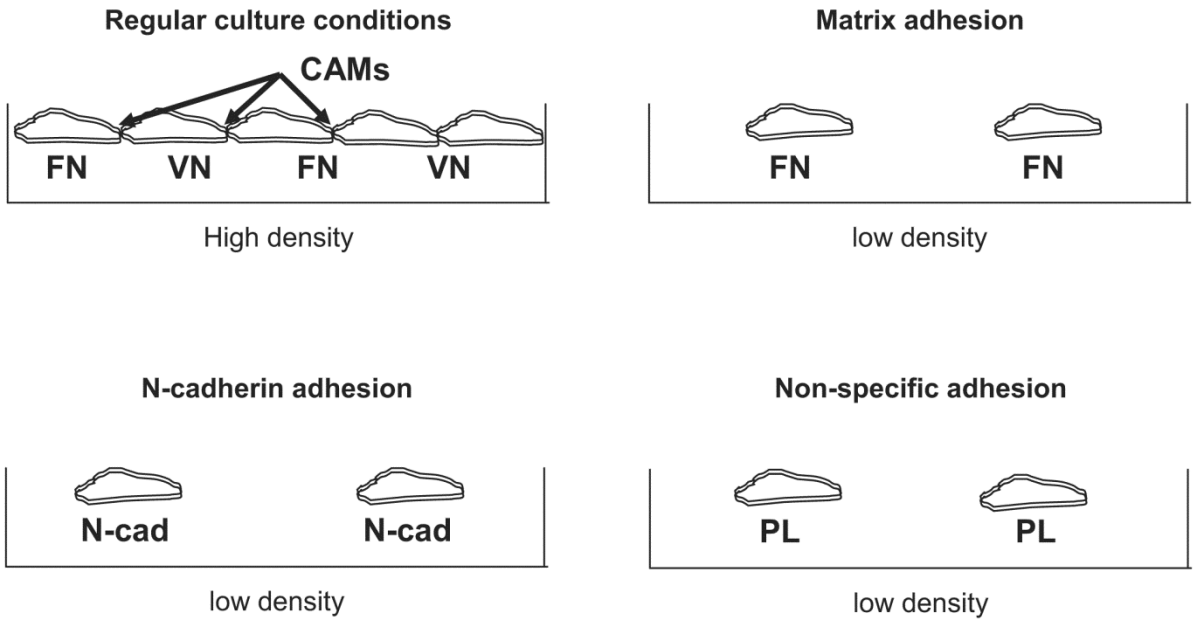


Figure S3.

Experimental set up for controlled N-cadherin engagement. In regular cell culture conditions (upper left), cells adhere to the substratum via adsorbed fibronectin (FN) and vitronectin (VN) provided by the serum (cell matrix adhesion) and adhere to each other via cadherins and other cell adhesion molecules (CAMs, cell-cell adhesion). To specifically activate either N-cadherin or fibronectin, GT1-7 cells were plated at low density on N-cad or FN, respectively. To deprive cells of specific cell adhesion, they were seeded on PL which mediates electrostatic cell-surface adhesion.

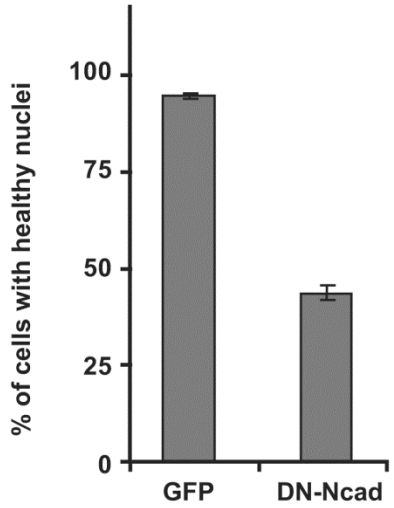


Figure S4.

Spreading of cells on N-cad does not mobilize the integrin pathway. GT1-7 cells were cultured on N-cad for 4 hours, then fixed and fluorescently stained for F-actin with phalloïdin (red) and with anti-paxillin antibodies (green). Paxillin staining remained diffuse in the cytoplasm of these cells indicating that integrins were not mobilized on this substrate. In contrast, when GT1-7 cells were cultured on fibronectin (FN) for 4 hours, they displayed expected stress fibers and focal adhesions in which both stainings were strongly accumulated, indicated that indeed integrins have been mobilized and activated in focal adhesions in these culture conditions. Scale bars: 20 µm.

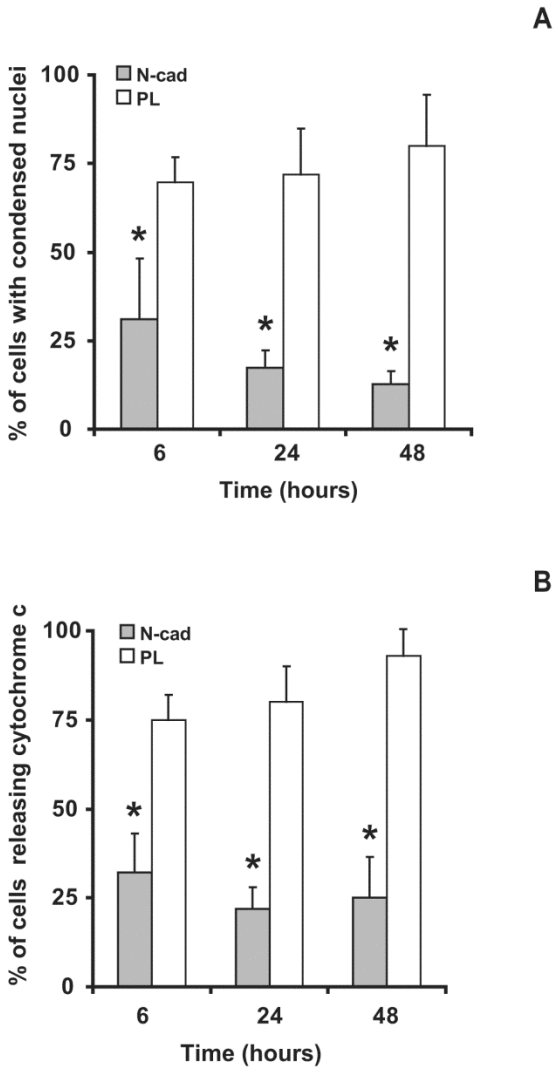


Figure S5.

Overexpression of a dominant negative form of N-cadherin drastically impairs the protective effect of N-cad on GT1-7 cells. GT1-7 cells were lipofected with either a dominant negative form of N-cadherin fused to DsRed (DN-Ncad), or GFP alone, starved for 24 hours, then spread on the N-cad substrate. After 24 hours, cells were fixed and processed for nuclei staining. The percentage of transfected cells with normal and condensed nuclei was determined for each condition in three independent experiments and given as mean ± SD.

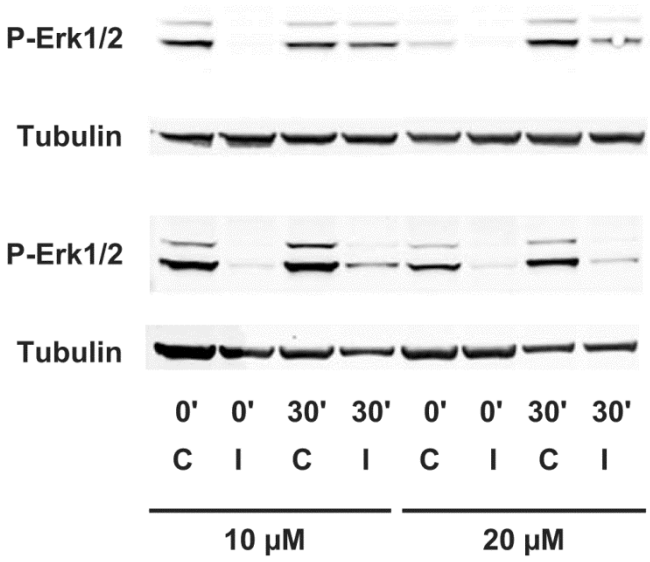


Figure S6.

Time course of GT1-7 cell death. Serum-starved cells were seeded at low density on PL or N-cad and grown for the indicated time in serum-free medium. Cell death was measured by nuclear condensation (**A**) and cytochrome c release (**B**). Asterisks indicate a significant difference ($P<0.05$) as compared with PL.

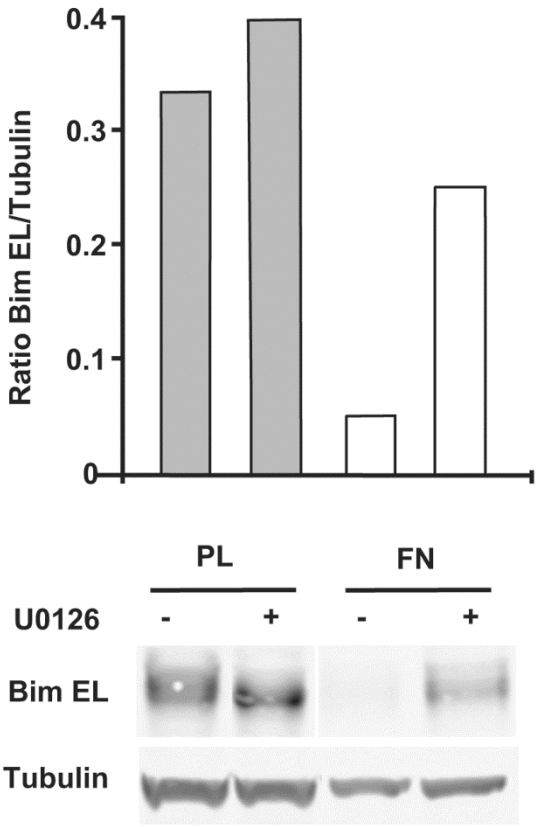
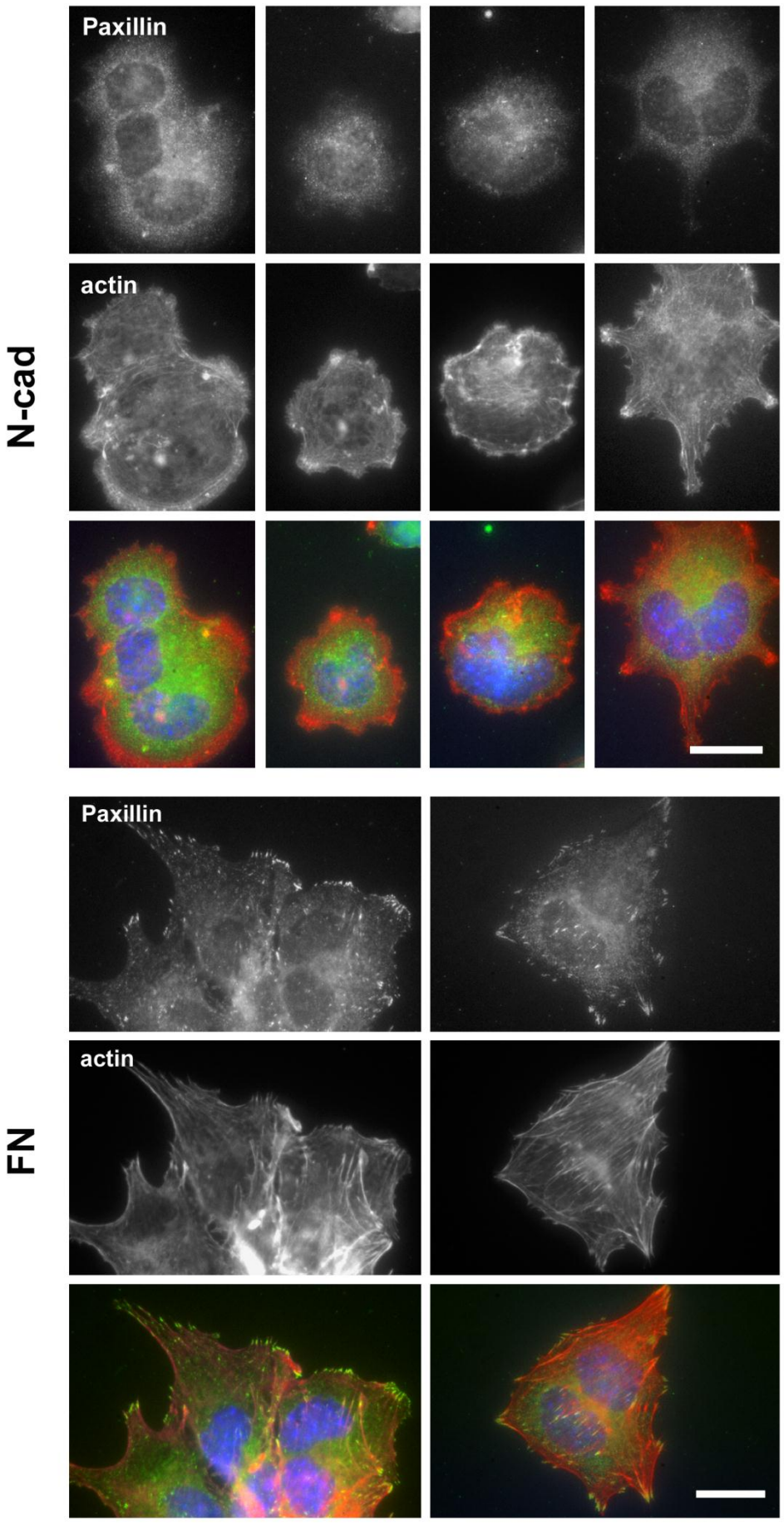


Figure S7.
Dose dependent action of U0126 inhibitor. Serum starved GT1-7 cells were treated (I) or not (C) with the U0126 inhibitor. Cultures were then subject to the calcium switch protocol and harvested just after (0′) or 30 minutes (30′) after calcium restoration. Proteins were extracted and analyzed for P-Erk1/2 content by western blotting. The results of two independent experiments are shown. The tubulin content in the extracts was used as a gel loading control.

Figure S8. **(see next page)**
Spreading of GT1-7 cells on fibronectin also down-regulates Bim-EL protein levels. Serum-starved cells were seeded at medium density on PL or FN and incubated with or without 20 µM U0126 for 24 hours. Equal amount of proteins were immunoblotted with either anti-Bim or anti-α-tubulin antibodies. Relative densities of Bim-EL were normalized to α-tubulin.


N-cad
Paxillin
actin
FN
Paxillin
actin

Discussion et perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons vu que l'engagement de la N-cadhérine influençait le recrutement et la dynamique des microtubules de manière différente selon le contexte cellulaire. De plus nous avons pu mettre en évidence que cette régulation était dépendante du cytosquelette d'actine. Par ailleurs nous avons pu constater que les microtubules, dans un contexte de cellule établissant des contacts intercellulaires stables, n'étaient pas essentiels à la formation et au maintien des adhésions dépendantes de la N-cadhérine. Ces résultats soulèvent de nombreuses questions notamment lorsqu'ils sont comparés à ceux de la littérature, qui dans le cas de contacts intercellulaires entre cellules épithéliales révèlent une régulation positive entre les cadhérines et les microtubules. Nous discuterons ici des différents mécanismes possibles de recrutement des microtubules par les cadhérines ainsi que du rôle que l'actine peut jouer. Nous aborderons également l'influence des microtubules sur les contacts intercellulaires.

1. Mécanismes régulant le recrutement des microtubules par les cadhérines

1.1. Distribution des microtubules dans les zones d'adhésion dépendantes de la N-cadhérine

L'engagement des cadhérines induit un remodelage du cytosquelette d'actine qui contribue à la formation et à la maturation des contacts intercellulaires. Cependant nous avons pu voir dans la partie introductive (voir chapitre III paragraphe 1.) que ces contacts dépendants des cadhérines permettaient également le recrutement d'un autre élément du cytosquelette, les microtubules. Nos résultats révèlent que dans le cas des cellules C2C12, les contacts dépendants de la N-cadhérine inhibent le recrutement des microtubules. Ces résultats ont été surprenants d'un premier abord car les travaux de Stehbens et de Ligon (Ligon et al., 2001; Stehbens et al., 2006) montrent que les microtubules sont dirigés vers les contacts et peuvent s'y ancrer. Par ailleurs des résultats antérieurs de l'équipe (Gavard et al., 2004) ont montré que les microtubules étaient distribués symétriquement et pénétraient dans toute la surface des cellules C2C12 étalées sur Ncad-Fc. J'ai moi-même pu observer au cours de mes expériences des cellules qui possédaient un réseau de microtubules pénétrant dans toute la cellule, malgré la présence d'accumulations radiales de β-caténine. Cependant après quantification de la surface de pénétration des microtubules j'ai pu constater que ces cellules étaient minoritaires. Il serait très intéressant de savoir pourquoi sur substrat Ncad-Fc nous pouvons avoir cette hétérogénéité au niveau du comportement des microtubules. Les substrats recombinants utilisés au cours de ces expériences sont homogènes. Cependant il se peut que des agrégations d'anticorps anti-fragment Fc ou de N-cadhérine recombinante puissent se créer, formant ainsi des zones d'adhésions hétérogènes. La conséquence directe serait de favoriser dans certains cas la

pénétration des microtubules. Ces aspects représentent les limites du système de substrat biomimétique dont il faut avoir conscience, mais ces substrats restent tout de même un outil puissant permettant de contrôler le type de récepteur d'adhésion que l'on souhaite étudier.

L'adhésion des cellules C2C12 sur substrat Ncad-Fc induit un remodelage du cytosquelette d'actine qui est très présent dans le lamellipode, que ce soit sous forme de câbles radiaux ou d'arcs contractiles. Par ailleurs nous avons pu observer que les microtubules étaient en grande majorité restreints avant cette actine lamellipodiale, dont le flux rétrograde était stimulé par les adhésions dépendantes des cadhérines et régulé par la myosine II. La destruction de l'actine ou encore l'inhibition de la myosine II lèvent l'inhibition de la pénétration des microtubules au sein des zones d'adhésion, mettant en évidence que le système d'acto-myosine agit comme une barrière physique pour les microtubules.

Nous pourrions penser que l'inhibition du recrutement des microtubules dans les zones d'adhésion que nous observons, à l'opposé des résultats publiés par d'autres équipes(Shaw et al., 2007; Stehbens et al., 2006), résultent de l'utilisation des substrats de Ncad-Fc par rapport à l'étude des contacts cellule-cellule. Pourtant Shaw et collaborateurs ont eux-aussi utilisé des substrats recombinants de Ncad-Fc et ont pu observer par TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) la présence de comètes EB1 au niveau des adhésions cellule-substrat Ncad-Fc(Shaw et al., 2007). Nous avons également essayé de visualiser les protéines des bouts (+) dans nos cellules C2C12 sur substrat recombinant à une distance de 100nm par TIRF (figure 47). Cependant nous n'avons jamais réussi à observer des protéines EB3 à cette distance lorsque les cellules étaient sur Ncad-Fc (figure 47 B) à l'inverse des cellules sur fibronectine (figure 47 A). Cela signifie que lorsque les cellules C2C12 établissent des contacts dépendants de la N-cadhérine, les microtubules sont exclus des zones d'adhésion proches de la membrane, confirmant que le recrutement des microtubules est régulé par l'arc d'acto-myosine très fortement présent dans ces zones d'adhésion.

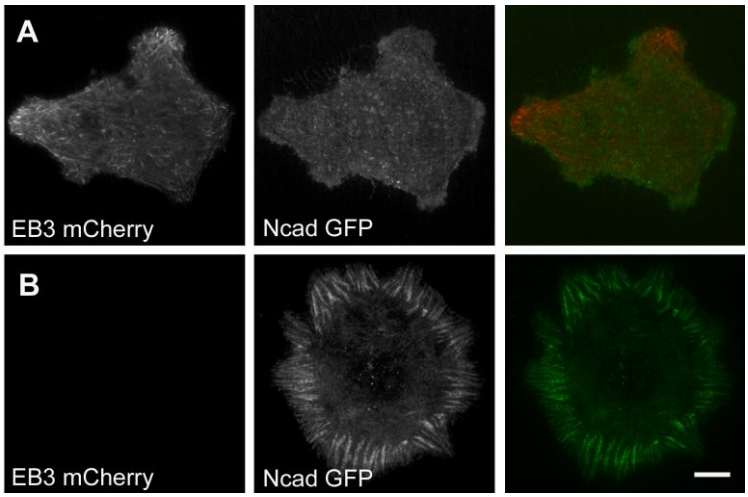


Figure 47 | Distribution des protéines des bouts (+) EB3 dans une zone proche des membranes de cellules C2C12 étalées sur substrats de fibronectine ou de Ncad-Fc.
Les cellules exprimant la Ncad-GFP et EB3-mCherry ont été dissociées et étalées sur des substrats de fibronectine FN (A) ou de Ncad-Fc (B) dans un milieu sans sérum. Les cellules ont été observées par microscopie TIRF, à une profondeur de 100 nm sous la membrane. EB3 est visible et accumulée dans les lamellipodes des cellules sur FN sous la membrane (A) tandis que les cellules sur Ncad-Fc ayant établi des contacts cadhérine-dépendants (B) ne présentent aucun signal relatif à EB3 dans les lamellipodes. Barre d'échelle: 20 µm.

Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les différences observées entre nos résultats et ceux de la littérature ne proviendraient pas uniquement des méthodes expérimentales. Tout d'abord le type cellulaire utilisé pourrait être important. En effet la majorité des études auxquelles nous avons fait référence dans l'introduction (tableau 3) ou dans la première partie des résultats a été effectuée sur des cellules épithéliales alors que nous avons utilisé des cellules myogéniques C2C12 non différenciées. Il serait intéressant de tester l'influence de la N-cadhérine sur le recrutement des microtubules dans des cellules de type épithélial, étant donné que la majorité des études a été conduite avec des cellules épithéliales. De plus l'utilisation de cellules C2C12 différenciées pourrait être testée, Zhang et collaborateurs ayant mis en évidence que les microtubules régulaient le niveau de cadhérines à la membrane plasmique dans ce contexte (Zhang et al., 2009). Le niveau d'engagement des cadhérines pourrait être également un paramètre intervenant dans la régulation du recrutement des microtubules, que se passerait-il si nous changions leur densité au sein des substrats ? Nous avons utilisé une densité de Ncad-Fc identique tout au long des expériences (1µg/cm^2) et il serait important de tester une gamme de concentrations différentes de substrat N-cadhérine pour une faire une courbe de type dose-réponse. Par ailleurs peu de travaux ont été effectués sur l'étude de la N-cadhérine, la plupart portant sur la E-cadhérine. Prakasam et collaborateurs ont mesuré les différences de forces d'adhésion homophilique entre E-cadhérines (contacts Ecad/Ecad) et N-cadhérines (Ncad/Ncad) et ont pu constater que les contacts de type E-cadhérine mettaient en jeu des forces d'adhésion supérieures à la N-cadhérine (Prakasam et al., 2006). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse que le type de cadhérine impliqué joue également un rôle dans le recrutement des microtubules. Il serait donc très intéressant d'étaler les cellules C2C12 transfectées par de la E-cadhérine sur des substrats de E-cadhérine (Ecad-Fc) et d'étudier le comportement des microtubules suite à l'engagement spécifique de la E-cadhérine.

D'après toutes ces données nous pouvons donc conclure que les contacts établis par les cellules C2C12 sur substrat Ncad-Fc induisent une exclusion des microtubules, à la fois dans les zones d'adhésion situées dans le lamellipode et au niveau de la membrane au contact. De plus nous avons montré que cette inhibition de recrutement était due à la formation d'un arc d'acto-myosine à l'arrière du lamellipode.

1.2. Impact de la polarité dans le recrutement des microtubules au niveau des zones d'adhésion

Les microtubules sont très importants dans la régulation des phénomènes de polarisation cellulaire, permettant aux cellules de se diviser de manière symétrique ou asymétrique, de migrer ou encore d'acquérir leur morphologie fonctionnelle (de Forges et al., 2012; Mimori-Kiyosue, 2011). Il a été démontré que les cadhérines régulaient la position du centrosome dans des astrocytes ou des neurones d'hippocampe et permettait leur polarisation, et dans le cas des neurones d'hippocampe favorisant ainsi la détermination du site d'émergence du premier neurite (Dupin et al., 2009; Gartner et al., 2012).

Lorsque les cellules C2C12 adhèrent sur des substrats de Ncad-Fc, leur morphologie est très circulaire (appelée « œuf au plat » (Gavard et al., 2004)) et ne sont pas polarisées. Malgré cela, toutes les cellules C2C12 n'adoptent pas cette structure non polarisée et peuvent avoir un lamellipode relativement discontinu. Dans ce cas précis, les microtubules peuvent s'engager dans ces protrusions comme si la rupture de la symétrie agissait comme un signal permettant leur pénétration. Par ailleurs au sein de l'équipe Mireille Lambert avait observé que les cellules C2C12 sur substrat de fibronectine passaient dans un premier temps par un stade non polarisé puis seulement plus tard acquéraient leur morphologie polygonale (observation également répertoriée dans (Zamir et al., 2000)). Ces observations suggèrent que les contacts dépendants des cadhérines (i) pourraient stopper les cellules dans leur processus de polarisation ou (ii) ne permettraient pas aux cellules de se polariser. Ce blocage ou cette absence de signal pourrait être en lien avec l'inhibition du recrutement des microtubules.

Il serait donc très intéressant de savoir (i) comment la N-cadhérine inhibe cette polarisation et (ii) s'il peut avoir un lien entre une rupture de la symétrie des cellules C2 sur Ncad-Fc et une réorganisation de l'actine que nous avons décrite comme contraignant physiquement les microtubules.

N-cadhérine et polarisation :

Pour cela l'influence de la N-cadhérine sur le centrosome pourrait être étudiée, et notamment connaître l'emplacement du centrosome (nous n'avons jamais révélé le centrosome par immunomarquage) et son comportement lors de la formation des contacts (expériences de vidéomicroscopie par visualisation du centrosome grâce à des constructions exprimant un domaine de la péricentrine fluorescente). Il serait également intéressant d'explorer les mécanismes de polarisation en étudiant l'expression et la localisation de complexes de polarité tels que les complexes PAR (Cdc42-Par3-Par6-aPKC), Crumb (Crb-PATJ-PALS) et Scribble (Scrib-Dlg-Lgl), qui sont des complexes protéiques très importants impliqués dans la génération et le maintien de tous types de polarisation (pour revue (Bryant and Mostov, 2008)).

N-cadhérine et rupture de la symétrie :

Des études antérieures réalisées dans l'équipe montrent que la Pi3-kinase est impliquée différemment dans les processus d'adhésion (Gavard et al., 2004; Lambert et al., 2002) Par ailleurs les travaux réalisés par Gärtner et collaborateurs démontrent que la génération de l'asymétrie neuronale induite par la N-cadhérine nécessite l'activité de la Pi3-kinase (Gartner et al., 2012). Des travaux préliminaires suggèrent que l'inhibition de la Pi3-kinase dans des cellules étalées sur Ncad-Fc induit un changement de la morphologie des cellules qui deviennent polarisées. De plus les microtubules pénètrent dans les protrusions membranaires formées suite aux traitements. Il serait donc très intéressant de poursuivre cette piste en quantifiant le recrutement et la dynamique des microtubules suite à la perturbation de la Pi3-kinase mais également en étudiant son effet sur le cytosquelette d'actine.

1.3. Modèles moléculaires entre les microtubules et les complexes cadhérines/caténines

Au cours de ma thèse j'ai cherché à savoir si un lien moléculaire entre les complexes cadhérines/caténines et les protéines associées aux microtubules pouvait exister.

Dans un premier temps j'ai immunoprécipité la β-caténine à partir d'extraits totaux de cellules C2C12 qui avaient été préalablement transfectées par les constructions CLIP-115-GFP et CLIP-170-GFP. Ces protéines sont des candidates intéressantes car Neukirchen et collaborateurs ont démontré dans un contexte neuronal que les protéines CLIP permettent aux microtubules de pénétrer correctement dans les cônes de croissance qui sont riches en actine (voir chapitre III de l'introduction, paragraphe 2.2.4.e. (Neukirchen and Bradke, 2011a)). Les résultats de ces immunoprécipitations révèlent que seule CLIP-115 serait présente dans un même complexe protéique contenant la β-caténine (voir figure 48). Nous pourrions approfondir l'étude de ette interaction en cherchant (i) si cette interaction peut-être directe (expériences de GST-pull down des protéines d'intérêt purifiées) et (ii) si cette interaction est directe, quels domaines des protéines sont impliqués dans leur association. De manière surprenante, je n'ai jamais réussi à co-immunoprécipiter la β-caténine par immunoprécipitation de CLIP-115 via un anticorps reconnaissant la GFP. Afin de vérifier cette interaction CLIP-115 – β-caténine il serait donc important d'utiliser une autre technique expérimentale et une alternative envisageable serait de faire du FRET (Fluorescence resonance energy transfer). Par ailleurs il serait également intéressant de connaître l'impact de la perturbation du lien β-caténine – CLIP-115 sur la capacité des microtubules à pénétrer dans les zones d'adhésion en inhibant l'expression de CLIP-115 (shRNA) ou en inhibant son association aux microtubules (surexpression de son domaine carboxy-terminal, voir figure 26B et (Neukirchen and Bradke, 2011a)). Ces résultats préliminaires suggèrent que les complexes cadhérines/caténines pourraient interagir directement avec les peoréines des bouts (+) des microtubules, comme proposé par (Shaw et al., 2007) et pas uniquement par l'intermédiaire de l'actine. Nous pourrions donc envisager que les cadhérines pourraient être capables de réguler le recrutement des microtubules de deux façons, par une interaction directe ou par une association via l'actine. Nous pourrions également poursuivre l'étude en cherchant d'autres partenaires possibles des caténines, par exemple en

immunoprécipitant la β-caténine et en analysant par spectrométrie de masse les protéines co-immunoprécipitées.

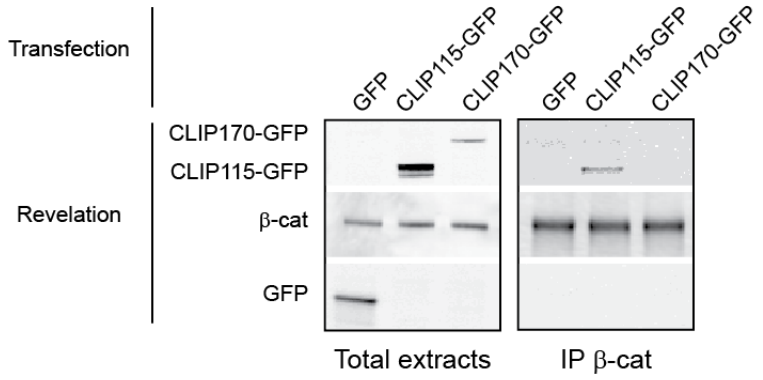


Figure 48 | **La protéine CLIP-115-GFP est co-immunoprécipitée par la β-caténine.**
Les cellules exprimant de la GFP, CLIP-115-GFP ou CLIP-170-GFP ont été lysées et la protéine β-caténine a été immunoprécipitée à partir de ces extraits totaux. Les protéines des extraits totaux (à gauche) et les protéines co-immunoprécipitées (western blot à droite) ont été anlysées par western blot avec des anticorps anti-β-caténine et anti-GFP. Seule la protéine CLIP-115-GFP est détectée dans le même immuno-complexe de la β-caténine.

La β-caténine n'est pas uniquement associée aux cadhérines et peut notamment interagir avec d'autres protéines associées aux microtubules (voir chapitre d'introduction, chapitre III paragraphe 2.1.), donc l'interaction observée avec CLIP-115 pourrait être indépendante des complexes cadhérines. Dans un deuxième temps, pour vérifier si la N-cadhérine était capable d'interagir avec des protéines des bouts (+), j'ai voulu immunoprécipiter la N-cadhérine. Dans ce cas, les cellules n'étaient pas transfectées et je n'ai pas réussi à co-immunoprécipter CLIP-115 et les protéines EB1 et EB3 n'ont jamais étaient retrouvées dans le même complexe que celui de la N-cadhérine, de la β-caténine ou encore l'α-caténine. Pourtant Zhang et collaborateurs ont pu observer à partir d'extraits de cellules C2C12 que les cadhérines ainsi que la β-caténine étaient co-immunoprécipitées par EB1 et EB1-GFP (Zhang et al., 2009). La différence de résultats pourrait provenir de l'état de différenciation des cellules C2C12, étant donné que nous utilisons des cellules C2C12 non différenciées alors que Zhang et collaborateurs ont effectué ces expériences avec des cellules C2C12 différenciées en myotubes.

1.4. Rôle du recrutement des microtubules au cours de l'apoptose

J'ai participé au cours de ma thèse à l'étude du rôle de l'engagement de la N-cadhérine dans la promotion de la survie neuronale. Nous avons pu montrer que la N-cadhérine stimulait la voie des kinases Mek1/2, permettant la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bim menant à sa dégradation (Lelievre et al., 2012). Bim est une protéine capable de se lier aux microtubules grâce à une interaction avec le moteur moléculaire dynéine (Puthalakath et al., 1999), mais se dissocie des microtubules après phosphorylation et déclenche l'apoptose (Chen and Zhou, 2004).

Nous avons pu voir dans l'introduction de ce manuscrit que la N-cadhérine pourrait recruter les microtubules via l'association de la dynéine avec la β-caténine (Ligon and Holzbaur, 2007; Ligon et al., 2001; Shaw et al., 2007) et que selon le contexte cellulaire les cadhérines recrutaient ou inhibaient le recrutement des microtubules (respectivement (Stehbens et al., 2006) et nos propres résultats, première partie). Ces résultats soulèvent la question suivante : est-ce-que la N-cadhérine pourrait réguler les phénomènes d'apoptose en influençant le cytosquelette de microtubules ? Il serait très intéressant de connaître la localisation de la protéine Bim en fonction de l'engagement des cadhérines, si elle est associée aux microtubules ou est libérée dans le cytoplasme. Pour cela des expériences d'immunomarquage (Bim, microtubules, complexes cadhérine/caténines) et d'immunoprécipitation de la N-cadhérine, de la dynéine ou de la tubuline pourraient être réalisées. Ensuite il serait important de savoir si la localisation de Bim est dépendante de la phosphorylation effectuée par les kinases Mek1/2. Un autre aspect qu'il serait important d'aborder est l'influence de la dynamique des microtubules sur l'apoptose dépendante de Bim. En effet des travaux ont mis en évidence que la stabilisation des microtubules était impliquée dans ces phénomènes d'apoptose, en influençant les niveaux d'expression de Bim (Li et al., 2005b; Purev et al., 2009).

2. Régulation de la dynamique des microtubules par les contacts N-cadhérine

Les contacts intercellulaires sont décrits dans la littérature comme permettant le recrutement et la régulation de la dynamique des microtubules (Chausovsky et al., 2000; Waterman-Storer et al., 2000). Au cours de mes expériences j'ai pu confirmer que les adhésions dépendantes de la N-cadhérine influençaient la dynamique des microtubules. Cependant j'ai pu observer des effets diamétralement opposés selon le type cellulaire utilisé. En effet, les contacts effectués sur Ncad-Fc par les cellules C2C12 et des neurones d'hippocampe de rat induisaient respectivement une diminution et une augmentation de la vitesse moyenne de progression des microtubules. Comment expliquer cette différence de réponse cellulaire ? Une hypothèse venant à l'esprit est celle du comportement de ces deux types de cellules sur substrat N-cadhérine. Les cellules C2C12 sont complètement immobiles sur ce substrat. En effet, nous avons eu l'occasion de les filmer sur de longues durées et elles ne montrent aucun signe de motilité. Inversement lorsque des neurones d'hippocampe adhèrent au substrat Ncad-Fc, non seulement ils émettent dès la première heure des neurites, mais en plus de la croissance neuritique stimulée par l'adhésion dépendante de la N-cadhérine (Bard et al., 2008), ils montrent une grande motilité de leurs corps cellulaires. Nous pourrions donc assimiler les cellules C2C12 et les neurones d'hippocampe respectivement à un modèle de cellules établissant des contacts intercellulaires stables et à un modèle de cellule en migration. Dans le cas des contacts stables, nos résultats sont conformes aux résultats de Waterman-Storer (Waterman-Storer et al., 2000), démontrant que lorsque deux cellules sont en contact alors les microtubules sont stabilisés. De manière intéressante dans cette étude lorsque les cellules sont en mouvement la dynamique des microtubules est stimulée au niveau de leur front de migration.

2.1. Spécificité de l'influence de la N-cadhérine sur la dynamique des microtubules

Nous avons pu voir dans le paragraphe précédent que les adhésions dépendantes de la N-cadhérine influencent la dynamique des microtubules. Cet effet pourrait être attribué à une absence de signal provenant d'autres récepteurs d'adhésion sur substrat Ncad-Fc. Dans le cas des cellules C2C12, le substrat contrôle utilisé est la fibronectine mimant des interactions cellule-matrice extracellulaire via l'engagement des intégrines. Or les intégrines sont capables de réguler le recrutement et la dynamique des microtubules (Etienne-Manneville, 2004; Hotta et al., 2010). Pour savoir si l'influence de la N-cadhérine était bien spécifique, nous avons analysé la vitesse moyenne des microtubules en exprimant une forme de la N-cadhérine tronquée de son domaine extracellulaire (Bard et al., 2008; Riehl et al., 1996) et étalé les cellules C2C12 ainsi que les neurones d'hippocampe sur substrats de Ncad-Fc et de fibronectine ou de poly-ornithine. Nous avons donc pu observer que l'expression de ce mutant dans les cellules C2C12 levait l'inhibition induite par l'adhésion N-cadhérine et inhibait la stimulation de la dynamique des microtubules dans les neurones. Par ailleurs l'expression de ce mutant N-cadhérine n'affectait en aucun cas la progression des microtubules sur substrat contrôle. C'est pourquoi nous pouvons affirmer que la N-cadhérine influence la dynamique des microtubules et que l'effet observé n'est pas dû à une absence de signal.

2.2. Implication du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine est un élément essentiel dans l'établissement des contacts dépendants des cadhérines et nous avons vu qu'il était impliqué dans l'inhibition du recrutement des microtubules lorsque les cellules C2C12 étaient étalées sur Ncad-Fc. Nous nous sommes donc demandé si la myosine II pouvait elle aussi réguler la dynamique des microtubules. Pour cela nous avons mesuré la vitesse moyenne des microtubules avant et après traitement des cellules C2C12 avec des drogues dépolymérisant l'actine ou inhibant la myosine II. Nous avons pu constater que lors de la destruction de l'actine la vitesse de progression moyenne des microtubules était augmentée alors que l'inhibition de la myosine II la diminuait encore plus. Ces résultats signifieraient que le réseau d'actine freinerait la progression des microtubules tandis que la myosine II la stimulerait. Par ailleurs il a été démontré auparavant dans l'équipe que l'inhibition de la myosine II dans les cellules C2C12 perturbait la formation des correcte des adhésions N-cadhérine (Lambert et al., 2007). Donc lorsque les cellules C2C12 sont sur substrat Ncad-Fc, la myosine II permettrait d'une part l'accumulation des cadhérines au contact, et d'autre part une régulation positive de la dynamique des microtubules. Cependant il faudrait également expliquer pourquoi l'inhibition de la myosine II entraîne la pénétration des microtubules dans les zones d'adhésion N-cadhérine. Une hypothèse serait que cette pénétration serait une conséquence indirecte de la déstructuration des contacts dépendants des cadhérines induite par l'inhibition de la myosine II.

En conclusion, nous pouvons suggérer que lorsque les cellules C2 établissent des contacts stables dépendants de la N-cadhérine, la dynamique des microtubules serait régulée (i) par le cytosquelette d'actine qui ralentirait les microtubules, (ii) par l'activité de la myosine II qui

permettrait de maintenir une certaine vitesse moyenne de progression. Des études ultérieures permettront de déterminer comment cette régulation est effectuée, notamment comment la myosine II pourrait permettre de stimuler la dynamique des microtubules (recrutement de protéines s'associant aux microtubules et régulant leur élongation ?). Il serait également intéressant de connaître l'impact de l'actine et de la myosine sur la dynamique des microtubules dans les cellules neuronales. Nous n'avons pas eu le temps d'effectuer ces expériences avec les neurones d'hippocampe et nous espérons pouvoir étudier cet aspect à l'avenir.

Afin de perturber les adhésions dépendantes de la N-cadhérine, nous avons exprimé un mutant de la N-cadhérine ne possédant pas de domaine extracellulaire (Bard et al., 2008; Riehl et al., 1996). Dans nos cellules C2C12 et dans les neurones d'hippocampe étalés sur Ncad-Fc, l'influence initiale de l'adhésion N-cadhérine sur la dynamique des microtubules était contrecarrée par ce mutant. Cependant l'expression de ce mutant N-cadhérine dans les cellules C2C12 ne change pas la capacité de pénétration des microtubules dans les zones d'adhésion dépendantes des cadhérines ni la dynamique de l'actine. Ces résultats signifient que les cadhérines pourraient réguler la dynamique et le recrutement des microtubules de manière indépendante du cytosquelette d'actine et nous ne pouvons donc exclure, comme suggéré par l'expérience de co-immunoprécipitation de CLIP-115, une régulation directe cadhérine-microtubules.

Etant donné que nos résultats mettent en avant une régulation de la dynamique des microtubules via l'actine, nous nous sommes donc intéressés à l'α-caténine. Cécile Boscher (ancienne étudiante en thèse dans l'équipe, travaux non publiés) s'était penchée sur les mécanismes d'action de l'α-caténine et ses travaux montrent que la surexpression du fragment 491-660 de l'α-caténine, contenant le domaine de modulation, dans des neurones d'hippocampe provoque une diminution de la croissance neuritique sur substrat N-cadhérine (Cécile Boscher, non publié), suggérant un rôle dominant négatif du fragment 491-660. Lorsque nous avons surexprimé ce même fragment dans des cellules C2C12 sur Ncad-Fc nous n'avons vu aucune différence dans la dynamique des microtubules. Cependant dans un contexte neuronal nous avons pu observer une diminution de la dynamique des microtubules, sur substrat N-cadhérine et aussi sur poly-ornithine. L'effet induit ne serait donc pas dépendant des adhésions cadhérine. Ces résultats seraient alors en accord avec l'étude réalisée par Benjamin et collaborateurs, qui ont démontré que l'αE-caténine était capable de réguler la dynamique de l'actine mais de manière indépendante des cadhérines. Nous pourrions émettre l'hypothèse que l'α-caténine régulerait la dynamique de l'actine dans les neurones au cours de l'élongation neuritique et que cette régulation pourrait influencer la vitesse de progression des microtubules.

3. Impact du cytosquelette de microtubules sur les adhésions dépendantes des cadhérines

Nous nous sommes principalement intéressés à l'influence que les contacts dépendants des cadhérines pouvaient avoir sur le cytosquelette de microtubules. Cependant nous avons également cherché à savoir quel rôle les microtubules pourraient avoir en retour dans la formation et le maintien des contacts. Mes résultats suggèrent que dans le système cellulaire de cellules C2C12, les contacts dépendants des cadhérines ne nécessiteraient pas les microtubules pour leur formation et leur maintien. Lorsque nous stabilisons les microtubules dans des cellules C2C12 sur substrat N-cadhérine après traitement au taxol, nous avons constaté que les microtubules sont restreints en-dehors des zones d'adhésion et que la β-caténine est accumulée plus fortement au niveau des accumulations radiales du lamellipode. Cela signifierait que la stabilisation des microtubules permettrait une plus forte concentration des complexes cadhérine/caténines aux contacts intercellulaires, en opposition au modèle proposé par Stehbens et collaborateurs démontrant que les microtubules favorisent la concentration de la E-cadhérine aux contacts intercellulaires (Stehbens et al., 2006). Il serait également très intéressant de connaître l'impact de la stabilisation des microtubules dans des neurones étalés sur Ncad-Fc, afin de savoir si la dynamique des microtubules est nécessaire à l'élongation neuritique stimulée par l'adhésion dépendante de la N-cadhérine.

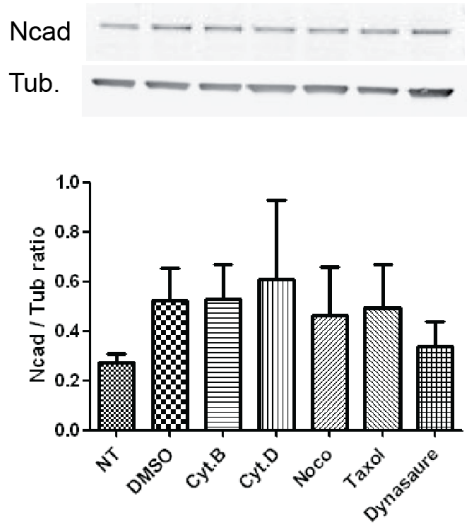


Figure 49 | Le cytosquelette d'actine et de microtubules ainsi que l'endocytose ne modifient pas la quantité totale de N-cadhérine.
Après 20 minutes de traitement avec différentes drogues, les cellules C2 en monocouche ont été lysées et la quantité totale de N-cadhérine contenue dans les extraits cellulaires a été analysée (histogramme à droite). 1 : NT = cellules non traitées. 2 : traitement avec du DMSO. 3 : Cyt.B = cytochalasine B 350nM. 4: Cyt.D = cytochalasine D 100nM. 5 : Noco = nocodazole 10µM. 6 : Taxol 10µM. 7 : Dynasaure 60µM (inhibiteur de la dynamine). Expérience réalisée par Pierre-Olivier Strale.

Nous pourrions formuler l'hypothèse que dans les cellules C2C12 sur substrat Ncad-Fc, les microtubules pourraient prendre part à la régulation de l'internalisation et de la dégradation des cadhérines. Nous avons obtenu des résultats contradictoires lorsque nous avons évalué la quantité totale de N-cadhérine après différents traitements de drogues contre l'actine et les microtubules. En effet nous avons observé dans un premier une augmentation de la quantité totale de N-cadhérine après un traitement au taxol, puis des expériences ultérieures ont montré que la quantité totale de N-cadhérine ne change pas, ni après inhibition de l'endocytose dépendante de la dynamine par des traitements avec du dynasaure (Tocris) (figure 49). Nous ne pouvons donc pas conclure, et il serait très intéressant de quantifier la quantité de N-cadhérine

présente à la membrane en réalisant des expériences de biotinylation de surface après ces différents traitements. Dans le cas où ni les microtubules ni l'actine n'influenceraient la quantité totale de N-cadhérine, et comme la stabilisation des microtubules par du taxol augmente l'accumulation de β-caténine aux contacts, alors nous pourrions formuler l'hypothèse selon laquelle les microtubules réguleraient la concentration de N-cadhérine aux contacts de manière négative. Cela confirmerait les travaux de Stehbens et collaborateurs qui démontrent également que les niveaux de E-cadhérine aux contacts intercellulaires ne seraient pas dépendants du trafic des cadhérines à la membrane (Stehbens et al., 2006).

4. Conclusion générale

En conclusion au cours de ma thèse j'ai pu montrer que l'engagement de la N-cadhérine au contact cellulaire influait sur le recrutement et la dynamique des microtubules. Par ailleurs selon si la cellule est dans un contexte migratoire ou est immobile, la dynamique des microtubules serait régulée respectivement de manière positive et négative. De plus nous avons mis en évidence que l'actine était un facteur important régulant la pénétration et la dynamique des microtubules. En effet nous avons montré que la formation de l'arc d'acto-myosine à l'arrière du lamellipode de cellules C2C12 sur substrat Ncad-Fc jouait le rôle de barrière physique pour la pénétration des microtubules. Cependant il reste encore à établir par quels mécanismes moléculaires la N-cadhérine influence le recrutement et la dynamique des microtubules. Par ailleurs il serait très intéressant de comprendre comment les microtubules participent à la régulation de l'accumulation des cadhérines au contact. De manière générale il me semble important, lorsque l'on parle de phénomènes d'adhésion dépendants des cadhérines, d'éviter de dissocier l'actine des microtubules. En effet ces deux éléments du cytosquelette sont d'une part influencés par les cadhérines, et d'autre part ils ont été démontrés pouvant coopérer dans des processus tels que la migration cellulaire.

A l'avenir, il sera important d'approfondir l'étude de la relation des cadhérines avec les cytosquelettes d'actine et de microtubules dans un contexte *in vivo*, notamment dans les phénomènes de croissance neuritique et du développement cérébral.

Bibliographie

Bibliographie

Abe, K., and M. Takeichi. 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105:13-19.

Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. 3. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. Experimental cell research. 62:389-398.

Adams, C.L., Y.T. Chen, S.J. Smith, and W.J. Nelson. 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. J Cell Biol. 142:1105-1119.

Adams, C.L., W.J. Nelson, and S.J. Smith. 1996. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. J Cell Biol. 135:1899-1911.

Akhmanova, A., C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. Cell. 104:923-935.

Akhmanova, A., and M.O. Steinmetz. 2008. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nature reviews. Molecular cell biology. 9:309-322.

Akhmanova, A., and A.S. Yap. 2008. Organizing junctions at the cell-cell interface. Cell. 135:791-793.

Al-Bassam, J., H. Kim, G. Brouhard, A. van Oijen, S.C. Harrison, and F. Chang. 2010. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. Developmental cell. 19:245-258.

Al-Bassam, J., M. van Breugel, S.C. Harrison, and A. Hyman. 2006. Stu2p binds tubulin and undergoes an open-to-closed conformational change. J Cell Biol. 172:1009-1022.

Aldaz, H., L.M. Rice, T. Stearns, and D.A. Agard. 2005. Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. Nature. 435:523-527.

Amin, N., and E. Vincan. 2012. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 17:784-804.

Amos, L., and A. Klug. 1974. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. J Cell Sci. 14:523-549.

Anastasiadis, P.Z. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. Biochim Biophys Acta. 1773:34-46.

Andrieux, A., P.A. Salin, M. Vernet, P. Kujala, J. Baratier, S. Gory-Faure, C. Bosc, H. Pointu, D. Proietto, A. Schweitzer, E. Denarier, J. Klumperman, and D. Job. 2002. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. Genes Dev. 16:2350-2364.

Angres, B., A. Barth, and W.J. Nelson. 1996. Mechanism for transition from initial to stable cell-cell adhesion: kinetic analysis of E-cadherin-mediated adhesion using a quantitative adhesion assay. J Cell Biol. 134:549-557.

Askham, J.M., K.T. Vaughan, H.V. Goodson, and E.E. Morrison. 2002. Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. Molecular biology of the cell. 13:3627-3645.

Asuri, S., J. Yan, N.C. Paranavitana, and L.A. Quilliam. 2008. E-cadherin dis-engagement activates the Rap1 GTPase. Journal of cellular biochemistry. 105:1027-1037.

Audebert, S., E. Desbruyeres, C. Gruszczynski, A. Koulakoff, F. Gros, P. Denoulet, and B. Edde. 1993. Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. Molecular biology of the cell. 4:615-626.

Bacallao, R., C. Antony, C. Dotti, E. Karsenti, E.H. Stelzer, and K. Simons. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. J Cell Biol. 109:2817-2832.

Balzac, F., M. Avolio, S. Degani, I. Kaverina, M. Torti, L. Silengo, J.V. Small, and S.F. Retta. 2005. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. J Cell Sci. 118:4765-4783.

Bard, L., C. Boscher, M. Lambert, R.M. Mege, D. Choquet, and O. Thoumine. 2008. A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. J Neurosci. 28:5879-5890.

Bartolini, F., J.B. Moseley, J. Schmoranzer, L. Cassimeris, B.L. Goode, and G.G. Gundersen. 2008. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. J Cell Biol. 181:523-536.

Baum, B., and M. Georgiou. 2011. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. J Cell Biol. 192:907-917.

Bednarczyk, J., and K. Lukasiuk. 2011. Tight junctions in neurological diseases. Acta neurobiologiae experimentalis. 71:393-408.

Bellett, G., J.M. Carter, J. Keynton, D. Goldspink, C. James, D.K. Moss, and M.M. Mogensen. 2009. Microtubule plus-end and minus-end capture at adherens junctions is involved in the assembly of apico-basal arrays in polarised epithelial cells. Cell motility and the cytoskeleton. 66:893-908.

Benjamin, J.M., A.V. Kwiatkowski, C. Yang, F. Korobova, S. Pokutta, T. Svitkina, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2010. AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. J Cell Biol. 189:339-352.

Bergin, E., J.S. Levine, J.S. Koh, and W. Lieberthal. 2000. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. Am J Physiol Renal Physiol. 278:F758-768.

Berx, G., and F. van Roy. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1:a003129.

Bieling, P., S. Kandels-Lewis, I.A. Telley, J. van Dijk, C. Janke, and T. Surrey. 2008. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. J Cell Biol. 183:1223-1233.

Bienz, M. 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. Current biology : CB. 15:R64-67.

Binder, L.I., A. Frankfurter, H. Kim, A. Caceres, M.R. Payne, and L.I. Rebhun. 1984. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 81:5613-5617.

Black, M.M., T. Slaughter, and I. Fischer. 1994. Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. J Neurosci. 14:857-870.

Bloomfield, S.A., and B. Volgyi. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. Nat Rev Neurosci. 10:495-506.

Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. Science. 296:1308-1313.

Bombardelli, L., and U. Cavallaro. 2010. Immunoglobulin-like cell adhesion molecules: novel signaling players in epithelial ovarian cancer. The international journal of biochemistry & cell biology. 42:590-594.

Bosc, C., J.D. Cronk, F. Pirollet, D.M. Watterson, J. Haiech, D. Job, and R.L. Margolis. 1996. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93:2125-2130.

Boscher, C., and R.M. Mege. 2008. Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. Cellular signalling. 20:1061-1072.

Bouissou, A., C. Verollet, A. Sousa, P. Sampaio, M. Wright, C.E. Sunkel, A. Merdes, and B. Raynaud-Messina. 2009. {gamma}-Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. J Cell Biol. 187:327-334.

Braga, V.M. 2002. Cell-cell adhesion and signalling. Curr Opin Cell Biol. 14:546-556.

Brasch, J., O.J. Harrison, B. Honig, and L. Shapiro. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. Trends in cell biology.

Broders-Bondon, F., P. Paul-Gilloteaux, C. Carlier, G.L. Radice, and S. Dufour. 2012. N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. Dev Biol. 364:178-191.

Brooke, M.A., D. Nitoiu, and D.P. Kelsell. 2012. Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. J Pathol. 226:158-171.

Bryant, D.M., and K.E. Mostov. 2008. From cells to organs: building polarized tissue. Nature reviews. Molecular cell biology. 9:887-901.

Bugyi, B., and M.F. Carlier. 2010. Control of actin filament treadmilling in cell motility. Annu Rev Biophys. 39:449-470.

Burks, J., and Y.M. Agazie. 2006. Modulation of alpha-catenin Tyr phosphorylation by SHP2 positively effects cell transformation induced by the constitutively active FGFR3. Oncogene. 25:7166-7179.

Burnette, D.T., A.W. Schaefer, L. Ji, G. Danuser, and P. Forscher. 2007. Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of Aplysia neuronal growth cones. Nat Cell Biol. 9:1360-1369.

Bush, M.S., D.A. Tonge, C. Woolf, and P.R. Gordon-Weeks. 1996. Expression of a developmentally regulated, phosphorylated isoform of microtubule-associated protein 1B in regenerating axons of the sciatic nerve. Neuroscience. 73:553-563.

Caceres, A., and K.S. Kosik. 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature. 343:461-463.

Caceres, A., J. Mautino, and K.S. Kosik. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. Neuron. 9:607-618.

Caceres, A., S. Potrebic, and K.S. Kosik. 1991. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. J Neurosci. 11:1515-1523.

Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. Nature reviews. Molecular cell biology. 11:237-251.

Caplow, M., and J. Shanks. 1996. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. Molecular biology of the cell. 7:663-675.

Carisey, A., and C. Ballestrem. 2011. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. European journal of cell biology. 90:157-163.

Carlier, M.F., D. Didry, R. Melki, M. Chabre, and D. Pantaloni. 1988. Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium. Biochemistry. 27:3555-3559.

Carnahan, R.H., A. Rokas, E.A. Gaucher, and A.B. Reynolds. 2010. The molecular evolution of the p120-catenin subfamily and its functional associations. PLoS One. 5:e15747.

Caro-Gonzalez, H.Y., L.N. Nejsum, K.A. Siemers, T.A. Shaler, W.J. Nelson, and A.I. Barth. 2012. Mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) regulates adenomatous polyposis coli during growth-factor-induced cell extension. J Cell Sci. 125:1247-1258.

Castano, J., G. Solanas, D. Casagolda, I. Raurell, P. Villagrasa, X.R. Bustelo, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2007. Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. Mol Cell Biol. 27:1745-1757.

Cavallaro, U., and E. Dejana. 2011. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. Nature reviews. Molecular cell biology. 12:189-197.

Cavey, M., M. Rauzi, P.F. Lenne, and T. Lecuit. 2008. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. Nature. 453:751-756.

Charrasse, S., M. Meriane, F. Comunale, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. J Cell Biol. 158:953-965.

Chausovsky, A., A.D. Bershadsky, and G.G. Borisy. 2000. Cadherin-mediated regulation of microtubule dynamics. Nat Cell Biol. 2:797-804.

Chen, D., and Q. Zhou. 2004. Caspase cleavage of BimEL triggers a positive feedback amplification of apoptotic signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101:1235-1240.

Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. J Cell Biol. 163:547-557.

Chervin-Petinot, A., M. Courcon, S. Almagro, A. Nicolas, A. Grichine, D. Grunwald, M.H. Prandini, P. Huber, and D. Gulino-Debrac. 2012. Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with alpha-catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. J Biol Chem. 287:7556-7572.

Chien, Y.H., N. Jiang, F. Li, F. Zhang, C. Zhu, and D. Leckband. 2008. Two stage cadherin kinetics require multiple extracellular domains but not the cytoplasmic region. J Biol Chem. 283:1848-1856.

Choi, H.J., S. Pokutta, G.W. Cadwell, A.A. Bobkov, L.A. Bankston, R.C. Liddington, and W.I. Weis. 2012. alphaE-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109:8576-8581.

Choi, Y., H. Chung, H. Jung, J.R. Couchman, and E.S. Oh. 2011. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. Matrix Biol. 30:93-99.

Chretien, D., and R.H. Wade. 1991. New data on the microtubule surface lattice. Biol Cell. 71:161-174.

Colello, D., S. Mathew, R. Ward, K. Pumiglia, and S.E. LaFlamme. 2012. Integrins regulate microtubule nucleating activity of centrosome through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signaling. J Biol Chem. 287:2520-2530.

Conacci-Sorrell, M., C. Ngouenet, and R.N. Eisenman. 2010. Myc-nick: a cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes alpha-tubulin acetylation and cell differentiation. Cell. 142:480-493.

Conde, C., and A. Caceres. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nat Rev Neurosci. 10:319-332.

Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature reviews. Cancer. 2:647-656.

Cowin, P., T.M. Rowlands, and S.J. Hatsell. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. Curr Opin Cell Biol. 17:499-508.

Creppe, C., L. Malinouskaya, M.L. Volvert, M. Gillard, P. Close, O. Malaise, S. Laguesse, I. Cornez, S. Rahmouni, S. Ormenese, S. Belachew, B. Malgrange, J.P. Chapelle, U. Siebenlist, G. Moonen, A. Chariot, and L. Nguyen. 2009. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. Cell. 136:551-564.

Daniel, J.M. 2007. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. Biochim Biophys Acta. 1773:59-68.

Daub, H., K. Gevaert, J. Vandekerckhove, A. Sobel, and A. Hall. 2001. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. J Biol Chem. 276:1677-1680.

Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. J Cell Biol. 163:525-534.

de Forges, H., A. Bouissou, and F. Perez. 2012. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. The international journal of biochemistry & cell biology. 44:266-274.

De Zeeuw, C.I., C.C. Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. Neuron. 19:1187-1199.

Deeks, M.J., and P.J. Hussey. 2005. Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. Nature reviews. Molecular cell biology. 6:954-964.

Dehmelt, L., F.M. Smart, R.S. Ozer, and S. Halpain. 2003. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. J Neurosci. 23:9479-9490.

Delgehyr, N., J. Sillibourne, and M. Bornens. 2005. Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. J Cell Sci. 118:1565-1575.

Delva, E., D.K. Tucker, and A.P. Kowalczyk. 2009. The desmosome. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1:a002543.

Denarier, E., A. Fourest-Lieuvin, C. Bosc, F. Pirollet, A. Chapel, R.L. Margolis, and D. Job. 1998. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95:6055-6060.

Dent, E.W., S.L. Gupton, and F.B. Gertler. 2011. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3.

Dent, E.W., A.V. Kwiatkowski, L.M. Mebane, U. Philippar, M. Barzik, D.A. Rubinson, S. Gupton, J.E. Van Veen, C. Furman, J. Zhang, A.S. Alberts, S. Mori, and F.B. Gertler. 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. Nat Cell Biol. 9:1347-1359.

des Portes, V., J.M. Pinard, P. Billuart, M.C. Vinet, A. Koulakoff, A. Carrie, A. Gelot, E. Dupuis, J. Motte, Y. Berwald-Netter, M. Catala, A. Kahn, C. Beldjord, and J. Chelly. 1998. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. Cell. 92:51-61.

Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol. 13:83-117.

Desai, A., S. Verma, T.J. Mitchison, and C.E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. Cell. 96:69-78.

Dimitrov, A., M. Quesnoit, S. Moutel, I. Cantaloube, C. Pous, and F. Perez. 2008. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. Science. 322:1353-1356.

Dixit, R., B. Barnett, J.E. Lazarus, M. Tokito, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur. 2009. Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106:492-497.

Drechsel, D.N., and M.W. Kirschner. 1994. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. Current biology : CB. 4:1053-1061.

Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005a. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. Cell. 123:903-915.

Drees, F., A. Reilein, and W.J. Nelson. 2005b. Cell-adhesion assays: fabrication of an E-cadherin substratum and isolation of lateral and Basal membrane patches. Methods Mol Biol. 294:303-320.

Dupin, I., E. Camand, and S. Etienne-Manneville. 2009. Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. J Cell Biol. 185:779-786.

Dutcher, S.K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. Curr Opin Cell Biol. 13:49-54.

Eastwood, S.L., L. Lyon, L. George, A. Andrieux, D. Job, and P.J. Harrison. 2007. Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. J Psychopharmacol. 21:635-644.

Edde, B., J. Rossier, J.P. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros, and P. Denoulet. 1990. Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. Science. 247:83-85.

El Sayegh, T.Y., P.D. Arora, L. Fan, C.A. Laschinger, P.A. Greer, C.A. McCulloch, and A. Kapus. 2005. Phosphorylation of N-cadherin-associated cortactin by Fer kinase regulates N-cadherin mobility and intercellular adhesion strength. Molecular biology of the cell. 16:5514-5527.

Erck, C., L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A.D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P.A. Salin, D. Job, and J. Wehland. 2005. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102:7853-7858.

Erickson, H.P. 2000. Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? Nat Cell Biol. 2:E93-96.

Etienne-Manneville, S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? Traffic. 5:470-477.

Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol. 17:375-412.

Faux, M.C., J.L. Coates, N.J. Kershaw, M.J. Layton, and A.W. Burgess. 2010. Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. PLoS One. 5:e14127.

Ferhat, L., A. Bernard, L. Ribas de Pouplana, Y. Ben-Ari, and M. Khrestchatisky. 1994. Structure, regional and developmental expression of rat MAP2d, a MAP2 splice variant encoding four microtubule-binding domains. Neurochemistry international. 25:327-338.

Fradley, R.L., G.F. O'Meara, R.J. Newman, A. Andrieux, D. Job, and D.S. Reynolds. 2005. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. Behavioural brain research. 163:257-264.

Franco, S.J., I. Martinez-Garay, C. Gil-Sanz, S.R. Harkins-Perry, and U. Muller. 2011. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. Neuron. 69:482-497.

Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nature reviews. Cancer. 3:362-374.

Friedl, P., and K. Wolf. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. J Cell Biol. 188:11-19.

Friocourt, G., A. Koulakoff, P. Chafey, D. Boucher, F. Fauchereau, J. Chelly, and F. Francis. 2003. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. Cereb Cortex. 13:620-626.

Fujimori, T., and M. Takeichi. 1993. Disruption of epithelial cell-cell adhesion by exogenous expression of a mutated nonfunctional N-cadherin. Molecular biology of the cell. 4:37-47.

Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, and W. Birchmeier. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. Nat Cell Biol. 4:222-231.

Fukata, M., M. Nakagawa, N. Itoh, A. Kawajiri, M. Yamaga, S. Kuroda, and K. Kaibuchi. 2001. Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering. Mol Cell Biol. 21:2165-2183.

Fukata, M., M. Nakagawa, and K. Kaibuchi. 2003. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. Curr Opin Cell Biol. 15:590-597.

Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002a. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell. 109:873-885.

Fukata, Y., T.J. Itoh, T. Kimura, C. Menager, T. Nishimura, T. Shiromizu, H. Watanabe, N. Inagaki, A. Iwamatsu, H. Hotani, and K. Kaibuchi. 2002b. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. Nat Cell Biol. 4:583-591.

Galjart, N. 2005. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. Nature reviews. Molecular cell biology. 6:487-498.

Garner, C.C., B. Brugg, and A. Matus. 1988. A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2. J Neurochem. 50:609-615.

Gartner, A., E.F. Fornasiero, S. Munck, K. Vennekens, E. Seuntjens, W.B. Huttner, F. Valtorta, and C.G. Dotti. 2012. N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. EMBO J.

Gavard, J., M. Lambert, I. Grosheva, V. Marthiens, T. Irinopoulou, J.F. Riou, A. Bershadsky, and R.M. Mege. 2004. Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. J Cell Sci. 117:257-270.

Gavard, J., and R.M. Mege. 2005. Once upon a time there was beta-catenin in cadherin-mediated signalling. Biol Cell. 97:921-926.

Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. Nature reviews. Molecular cell biology. 10:21-33.

Geraldo, S., U.K. Khanzada, M. Parsons, J.K. Chilton, and P.R. Gordon-Weeks. 2008. Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. Nat Cell Biol. 10:1181-1189.

Giannone, G., R.M. Mege, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. Trends Cell Biol. 19:475-486.

Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W.J. Kranewitter, and S.J. Winder. 2002. Functional plasticity of CH domains. FEBS letters. 513:98-106.

Glaven, J.A., I. Whitehead, S. Bagrodia, R. Kay, and R.A. Cerione. 1999. The Dbl-related protein, Lfc, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells. J Biol Chem. 274:2279-2285.

Gleeson, J.G., K.M. Allen, J.W. Fox, E.D. Lamperti, S. Berkovic, I. Scheffer, E.C. Cooper, W.B. Dobyns, S.R. Minnerath, M.E. Ross, and C.A. Walsh. 1998. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. Cell. 92:63-72.

Gonzalez-Billault, C., M. Engelke, E.M. Jimenez-Mateos, F. Wandosell, A. Caceres, and J. Avila. 2002. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. J Neurosci Res. 67:713-719.

Goodson, H.V., S.B. Skube, R. Stalder, C. Valetti, T.E. Kreis, E.E. Morrison, and T.A. Schroer. 2003. CLIP-170 interacts with dynactin complex and the APC-binding protein EB1 by different mechanisms. Cell motility and the cytoskeleton. 55:156-173.

Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. Cell. 143:263-274.

Goshima, G., R. Wollman, S.S. Goodwin, N. Zhang, J.M. Scholey, R.D. Vale, and N. Stuurman. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in Drosophila S2 cells. Science. 316:417-421.

Gradin, H.M., N. Larsson, U. Marklund, and M. Gullberg. 1998. Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells. J Cell Biol. 140:131-141.

Grishchuk, E.L., M.I. Molodtsov, F.I. Ataullakhanov, and J.R. McIntosh. 2005. Force production by disassembling microtubules. Nature. 438:384-388.

Grossmann, J. 2002. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". Apoptosis. 7:247-260.

Guillaud, L., C. Bosc, A. Fourest-Lieuvin, E. Denarier, F. Pirollet, L. Lafanechere, and D. Job. 1998. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. J Cell Biol. 142:167-179.

Gumbiner, B., B. Stevenson, and A. Grimaldi. 1988. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. J Cell Biol. 107:1575-1587.

Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nature reviews. Molecular cell biology. 6:622-634.

Gundersen, G.G., M.H. Kalnoski, and J.C. Bulinski. 1984. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. Cell. 38:779-789.

Guo, H.B., H. Johnson, M. Randolph, and M. Pierce. 2009. Regulation of homotypic cell-cell adhesion by branched N-glycosylation of N-cadherin extracellular EC2 and EC3 domains. J Biol Chem. 284:34986-34997.

Gupton, S.L., and F.B. Gertler. 2007. Filopodia: the fingers that do the walking. Sci STKE. 2007:re5.

Hage, B., K. Meinel, I. Baum, K. Giehl, and A. Menke. 2009. Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells. Cell communication and signaling : CCS. 7:23.

Halpain, S., and L. Dehmelt. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. Genome biology. 7:224.

Harris, T.J., and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. Nature reviews. Molecular cell biology. 11:502-514.

Harrison, O.J., X. Jin, S. Hong, F. Bahna, G. Ahlsen, J. Brasch, Y. Wu, J. Vendome, K. Felsovalyi, C.M. Hampton, R.B. Troyanovsky, A. Ben-Shaul, J. Frank, S.M. Troyanovsky, L. Shapiro, and B. Honig. 2011. The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. Structure. 19:244-256.

Hartsock, A., and W.J. Nelson. 2012. Competitive Regulation of E-Cadherin JuxtaMembrane Domain Degradation by p120-Catenin Binding and Hakai-Mediated Ubiquitination. PLoS One. 7:e37476.

Hazan, R.B., R. Qiao, R. Keren, I. Badano, and K. Suyama. 2004. Cadherin switch in tumor progression. Ann N Y Acad Sci. 1014:155-163.

Hermiston, M.L., and J.I. Gordon. 1995. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. J Cell Biol. 129:489-506.

Hirano, S., A. Nose, K. Hatta, A. Kawakami, and M. Takeichi. 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. J Cell Biol. 105:2501-2510.

Hirano, S., and M. Takeichi. 2012. Cadherins in brain morphogenesis and wiring. Physiol Rev. 92:597-634.

Hirokawa, N., and R. Takemura. 2004. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. Experimental cell research. 301:50-59.

Hofmann, C., F. Obermeier, M. Artinger, M. Hausmann, W. Falk, J. Schoelmerich, G. Rogler, and J. Grossmann. 2007. Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells. Gastroenterology. 132:587-600.

Hong, J.Y., J.I. Park, M. Lee, W.A. Munoz, R.K. Miller, H. Ji, D. Gu, S.Y. Sokol, and P.D. McCrea. 2012. Down's-syndrome-related kinase Dyrk1A modulates the p120-catenin-Kaiso trajectory of the Wnt signaling pathway. J Cell Sci. 125:561-569.

Hong, S.E., Y.Y. Shugart, D.T. Huang, S.A. Shahwan, P.E. Grant, J.O. Hourihane, N.D. Martin, and C.A. Walsh. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nature genetics. 26:93-96.

Honnappa, S., S.M. Gouveia, A. Weisbrich, F.F. Damberger, N.S. Bhavesh, H. Jawhari, I. Grigoriev, F.J. van Rijssel, R.M. Buey, A. Lawera, I. Jelesarov, F.K. Winkler, K. Wuthrich, A. Akhmanova, and M.O. Steinmetz. 2009. An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. Cell. 138:366-376.

Honnappa, S., O. Okhrimenko, R. Jaussi, H. Jawhari, I. Jelesarov, F.K. Winkler, and M.O. Steinmetz. 2006. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. Mol Cell. 23:663-671.

Hosking, C.R., F. Ulloa, C. Hogan, E.C. Ferber, A. Figueroa, K. Gevaert, W. Birchmeier, J. Briscoe, and Y. Fujita. 2007. The transcriptional repressor Glis2 is a novel binding partner for p120 catenin. Molecular biology of the cell. 18:1918-1927.

Hotta, A., T. Kawakatsu, T. Nakatani, T. Sato, C. Matsui, T. Sukezane, T. Akagi, T. Hamaji, I. Grigoriev, A. Akhmanova, Y. Takai, and Y. Mimori-Kiyosue. 2010. Laminin-based cell adhesion anchors microtubule plus ends to the epithelial cell basal cortex through LL5alpha/beta. J Cell Biol. 189:901-917.

Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, and T.P. Yao. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. Nature. 417:455-458.

Huber, A.H., and W.I. Weis. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. Cell. 105:391-402.

Hur, E.M., Saijilafu, B.D. Lee, S.J. Kim, W.L. Xu, and F.Q. Zhou. 2011. GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules. Genes Dev. 25:1968-1981.

Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. Physiol Rev. 91:119-149.

Huveneers, S., and E.H. Danen. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. J Cell Sci. 122:1059-1069.

Hyman, A.A., S. Salser, D.N. Drechsel, N. Unwin, and T.J. Mitchison. 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. Molecular biology of the cell. 3:1155-1167.

Inagaki, N., K. Chihara, N. Arimura, C. Menager, Y. Kawano, N. Matsuo, T. Nishimura, M. Amano, and K. Kaibuchi. 2001. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. Nature neuroscience. 4:781-782.

Inclan, Y.F., and E. Nogales. 2001. Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. J Cell Sci. 114:413-422.

Ishiyama, N., S.H. Lee, S. Liu, G.Y. Li, M.J. Smith, L.F. Reichardt, and M. Ikura. 2010. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. Cell. 141:117-128.

Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Moroi, and S. Tsukita. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. J Cell Biol. 138:181-192.

Ivanov, A.I., I.C. McCall, B. Babbin, S.N. Samarin, A. Nusrat, and C.A. Parkos. 2006. Microtubules regulate disassembly of epithelial apical junctions. BMC cell biology. 7:12.

Ivanov, A.I., I.C. McCall, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2004. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. Mol Biol Cell. 15:2639-2651.

Jaffe, S.H., D.R. Friedlander, F. Matsuzaki, K.L. Crossin, B.A. Cunningham, and G.M. Edelman. 1990. Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-out. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87:3589-3593.

Jaglin, X.H., and J. Chelly. 2009. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. Trends Genet. 25:555-566.

Jamal, B.T., M. Nita-Lazar, Z. Gao, B. Amin, J. Walker, and M.A. Kukuruzinska. 2009. N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct beta-catenin- and gamma-catenin-containing AJs. Cell Health Cytoskelet. 2009:67-80.

Janke, C., and J.C. Bulinski. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nature reviews. Molecular cell biology. 12:773-786.

Jaulin, F., and G. Kreitzer. 2010. KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. J Cell Biol. 190:443-460.

Jefferson, J.J., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2004. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. Nature reviews. Molecular cell biology. 5:542-553.

Jiang, G., Y. Wang, S. Dai, Y. Liu, M. Stoecker, and E. Wang. 2012. P120-catenin isoforms 1 and 3 regulate proliferation and cell cycle of lung cancer cells via beta-catenin and Kaiso respectively. PLoS One. 7:e30303.

Job, D., C.T. Rauch, E.H. Fischer, and R.L. Margolis. 1982. Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. Biochemistry. 21:509-515.

Jossin, Y., and J.A. Cooper. 2011. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. Nat Neurosci. 14:697-703.

Kadir, S., J.W. Astin, L. Tahtamouni, P. Martin, and C.D. Nobes. 2011. Microtubule remodelling is required for the front-rear polarity switch during contact inhibition of locomotion. J Cell Sci. 124:2642-2653.

Kadowaki, M., S. Nakamura, O. Machon, S. Krauss, G.L. Radice, and M. Takeichi. 2007. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. Dev Biol. 304:22-33.

Kanner, S.B., A.B. Reynolds, R.R. Vines, and J.T. Parsons. 1990. Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87:3328-3332.

Kappeler, C., Y. Saillour, J.P. Baudoin, F.P. Tuy, C. Alvarez, C. Houbron, P. Gaspar, G. Hamard, J. Chelly, C. Metin, and F. Francis. 2006. Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. Hum Mol Genet. 15:1387-1400.

Karabay, A., W. Yu, J.M. Solowska, D.H. Baird, and P.W. Baas. 2004. Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules. J Neurosci. 24:5778-5788.

Kardon, J.R., and R.D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. Nature reviews. Molecular cell biology. 10:854-865.

Karsenti, E., S. Kobayashi, T. Mitchison, and M. Kirschner. 1984. Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. J Cell Biol. 98:1763-1776.

Kaufmann, U., J. Kirsch, A. Irintchev, A. Wernig, and A. Starzinski-Powitz. 1999. The M-cadherin catenin complex interacts with microtubules in skeletal muscle cells: implications for the fusion of myoblasts. J Cell Sci. 112 (Pt 1):55-68.

Kawasaki, Y., T. Senda, T. Ishidate, R. Koyama, T. Morishita, Y. Iwayama, O. Higuchi, and T. Akiyama. 2000. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. Science. 289:1194-1197.

Kawauchi, T., K. Sekine, M. Shikanai, K. Chihama, K. Tomita, K. Kubo, K. Nakajima, Y. Nabeshima, and M. Hoshino. 2010. Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. Neuron. 67:588-602.

Keating, T.J., and G.G. Borisy. 1999. Centrosomal and non-centrosomal microtubules. Biol Cell. 91:321-329.

Kee, S.H., and P.M. Steinert. 2001. Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin. Molecular biology of the cell. 12:1983-1993.

Kim, N.G., E. Koh, X. Chen, and B.M. Gumbiner. 2011. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108:11930-11935.

Kinbara, K., L.E. Goldfinger, M. Hansen, F.L. Chou, and M.H. Ginsberg. 2003. Ras GTPases: integrins' friends or foes? Nature reviews. Molecular cell biology. 4:767-776.

Kobielak, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. Nat Cell Biol. 6:21-30.

Kollman, J.M., A. Merdes, L. Mourey, and D.A. Agard. 2011. Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. Nature reviews. Molecular cell biology. 12:709-721.

Komarova, Y., C.O. De Groot, I. Grigoriev, S.M. Gouveia, E.L. Munteanu, J.M. Schober, S. Honnappa, R.M. Buey, C.C. Hoogenraad, M. Dogterom, G.G. Borisy, M.O. Steinmetz, and A. Akhmanova. 2009. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. J Cell Biol. 184:691-706.

Komarova, Y., G. Lansbergen, N. Galjart, F. Grosveld, G.G. Borisy, and A. Akhmanova. 2005. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. Molecular biology of the cell. 16:5334-5345.

Komarova, Y.A., A.S. Akhmanova, S. Kojima, N. Galjart, and G.G. Borisy. 2002. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. J Cell Biol. 159:589-599.

Kong, Z., T. Hotta, Y.R. Lee, T. Horio, and B. Liu. 2010. The {gamma}-tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in Arabidopsis thaliana. Plant Cell. 22:191-204.

Koslov, E.R., P. Maupin, D. Pradhan, J.S. Morrow, and D.L. Rimm. 1997. Alpha-catenin can form asymmetric homodimeric complexes and/or heterodimeric complexes with beta-catenin. J Biol Chem. 272:27301-27306.

Kostetskii, I., J. Li, Y. Xiong, R. Zhou, V.A. Ferrari, V.V. Patel, J.D. Molkentin, and G.L. Radice. 2005. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. Circ Res. 96:346-354.

Krishnan, S., G.E. Fernandez, D.B. Sacks, and N.V. Prasadarao. 2012. IQGAP1 mediates the disruption of adherens junctions to promote Escherichia coli K1 invasion of brain endothelial cells. Cellular microbiology.

Kumar, N., and M. Flavin. 1981. Preferential action of a brain detyrosinolating carboxypeptidase on polymerized tubulin. J Biol Chem. 256:7678-7686.

Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. Science. 281:832-835.

Kwiatkowski, A.V., D.A. Rubinson, E.W. Dent, J. Edward van Veen, J.D. Leslie, J. Zhang, L.M. Mebane, U. Philippar, E.M. Pinheiro, A.A. Burds, R.T. Bronson, S. Mori, R. Fassler, and F.B. Gertler. 2007. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. Neuron. 56:441-455.

L'Hernault, S.W., and J.L. Rosenbaum. 1985. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. Biochemistry. 24:473-478.

Lacroix, B., J. van Dijk, N.D. Gold, J. Guizetti, G. Aldrian-Herrada, K. Rogowski, D.W. Gerlich, and C. Janke. 2010. Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. J Cell Biol. 189:945-954.

LaFlamme, S.E., S.K. Akiyama, and K.M. Yamada. 1992. Regulation of fibronectin receptor distribution. J Cell Biol. 117:437-447.

Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. J Cell Biol. 157:469-479.

Lambert, M., F. Padilla, and R.M. Mege. 2000. Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. J Cell Sci. 113 (Pt 12):2207-2219.

Lambert, M., O. Thoumine, J. Brevier, D. Choquet, D. Riveline, and R.M. Mege. 2007. Nucleation and growth of cadherin adhesions. Exp Cell Res. 313:4025-4040.

Lammermann, T., B.L. Bader, S.J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D.R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. Nature. 453:51-55.

Lansbergen, G., Y. Komarova, M. Modesti, C. Wyman, C.C. Hoogenraad, H.V. Goodson, R.P. Lemaitre, D.N. Drechsel, E. van Munster, T.W. Gadella, Jr., F. Grosveld, N. Galjart, G.G. Borisy, and A. Akhmanova. 2004. Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. J Cell Biol. 166:1003-1014.

Laubli, H., and L. Borsig. 2010. Selectins promote tumor metastasis. Seminars in cancer biology. 20:169-177.

Le Clainche, C., and M.F. Carlier. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. Physiol Rev. 88:489-513.

Lee, H., U. Engel, J. Rusch, S. Scherrer, K. Sheard, and D. Van Vactor. 2004. The microtubule plus end tracking protein Orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. Neuron. 42:913-926.

Lelièvre, E., E. Wolff, R.M. Mege, and H. Birbes. 2010. N-cadherin prevents neural cells to undergo apoptosis through Bim down-regulation. Submitted.

Lelievre, E.C., C. Plestant, C. Boscher, E. Wolff, R.M. Mege, and H. Birbes. 2012. N-cadherin mediates neuronal cell survival through Bim down-regulation. PLoS One. 7:e33206.

Lewis, S.A., G. Tian, and N.J. Cowan. 1997. The alpha- and beta-tubulin folding pathways. Trends in cell biology. 7:479-484.

Li, J., V.V. Patel, I. Kostetskii, Y. Xiong, A.F. Chu, J.T. Jacobson, C. Yu, G.E. Morley, J.D. Molkentin, and G.L. Radice. 2005a. Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. Circ Res. 97:474-481.

Li, R., T. Moudgil, H.J. Ross, and H.M. Hu. 2005b. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. Cell Death Differ. 12:292-303.

Lien, W.H., O. Klezovitch, T.E. Fernandez, J. Delrow, and V. Vasioukhin. 2006. alphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. Science. 311:1609-1612.

Ligon, L.A., and E.L. Holzbaur. 2007. Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly. Traffic. 8:808-819.

Ligon, L.A., S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. Nat Cell Biol. 3:913-917.

Ligon, L.A., S.S. Shelly, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2003. The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization. Molecular biology of the cell. 14:1405-1417.

Lilien, J., and J. Balsamo. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. Curr Opin Cell Biol. 17:459-465.

Liu, H., S. Komiya, M. Shimizu, Y. Fukunaga, and A. Nagafuchi. 2007. Involvement of p120 carboxy-terminal domain in cadherin trafficking. Cell structure and function. 32:127-137.

Lorenowicz, M.J., M. Fernandez-Borja, A.M. van Stalborch, M.A. van Sterkenburg, P.S. Hiemstra, and P.L. Hordijk. 2007. Microtubule dynamics and Rac-1 signaling independently regulate barrier function in lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 293:L1321-1331.

Maiden, S.L., and J. Hardin. 2011. The secret life of alpha-catenin: moonlighting in morphogenesis. J Cell Biol. 195:543-552.

Mandelkow, E.M., R. Schultheiss, R. Rapp, M. Muller, and E. Mandelkow. 1986. On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. J Cell Biol. 102:1067-1073.

Mansfield, S.G., J. Diaz-Nido, P.R. Gordon-Weeks, and J. Avila. 1991. The distribution and phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP 1B in growth cones. Journal of neurocytology. 20:1007-1022.

Marcos, S., J. Moreau, S. Backer, D. Job, A. Andrieux, and E. Bloch-Gallego. 2009. Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. PLoS One. 4:e5405.

Margadant, C., H.N. Monsuur, J.C. Norman, and A. Sonnenberg. 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. Curr Opin Cell Biol. 23:607-614.

Marthiens, V., J. Gavard, F. Padilla, C. Monnet, V. Castellani, M. Lambert, and R.M. Mege. 2005. A novel function for cadherin-11 in the regulation of motor axon elongation and fasciculation. Molecular and cellular neurosciences. 28:715-726.

Mary, S., S. Charrasse, M. Meriane, F. Comunale, P. Travo, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. Mol Biol Cell. 13:285-301.

Matsunaga, M., K. Hatta, A. Nagafuchi, and M. Takeichi. 1988. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. Nature. 334:62-64.

Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. EMBO J. 21:6820-6831.

Maul, R.S., and D.D. Chang. 1999. EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. Oncogene. 18:7838-7841.

Maul, R.S., Y. Song, K.J. Amann, S.C. Gerbin, T.D. Pollard, and D.D. Chang. 2003. EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. J Cell Biol. 160:399-407.

McGrath, J.A., G.H. Ashton, J.E. Mellerio, J.C. Salas-Alanis, O. Swensson, J.R. McMillan, and R.A. Eady. 1999. Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing non-sense or frameshift mutations. J Invest Dermatol. 113:314-321.

McKean, P.G., S. Vaughan, and K. Gull. 2001. The extended tubulin superfamily. J Cell Sci. 114:2723-2733.

Mege, R.M., J. Gavard, and M. Lambert. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol. 18:541-548.

Mege, R.M., F. Matsuzaki, W.J. Gallin, J.I. Goldberg, B.A. Cunningham, and G.M. Edelman. 1988. Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 85:7274-7278.

Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal. 2012. Methods for cell and particle tracking. Methods Enzymol. 504:183-200.

Meng, W., Y. Mushika, T. Ichii, and M. Takeichi. 2008. Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. Cell. 135:948-959.

Meng, W., and M. Takeichi. 2009. Adherens junction: molecular architecture and regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1:a002899.

Mimori-Kiyosue, Y. 2011. Shaping microtubules into diverse patterns: molecular connections for setting up both ends. Cytoskeleton (Hoboken). 68:603-618.

Mimori-Kiyosue, Y., I. Grigoriev, G. Lansbergen, H. Sasaki, C. Matsui, F. Severin, N. Galjart, F. Grosveld, I. Vorobjev, S. Tsukita, and A. Akhmanova. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. J Cell Biol. 168:141-153.

Mishima, M., R. Maesaki, M. Kasa, T. Watanabe, M. Fukata, K. Kaibuchi, and T. Hakoshima. 2007. Structural basis for tubulin recognition by cytoplasmic linker protein 170 and its autoinhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104:10346-10351.

Mitchell, D.R. 2010. Polyglutamylation: the GLU that makes microtubules sticky. Current biology : CB. 20:R234-236.

Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. Nature. 312:237-242.

Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. Neuron. 1:761-772.

Moores, C.A., M. Perderiset, C. Kappeler, S. Kain, D. Drummond, S.J. Perkins, J. Chelly, R. Cross, A. Houdusse, and F. Francis. 2006. Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. EMBO J. 25:4448-4457.

Morgan, M.R., M.J. Humphries, and M.D. Bass. 2007. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. Nature reviews. Molecular cell biology. 8:957-969.

Moseley, J.B., F. Bartolini, K. Okada, Y. Wen, G.G. Gundersen, and B.L. Goode. 2007. Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. J Biol Chem. 282:12661-12668.

Moss, D.K., G. Bellett, J.M. Carter, M. Liovic, J. Keynton, A.R. Prescott, E.B. Lane, and M.M. Mogensen. 2007. Ninein is released from the centrosome and moves bi-directionally along microtubules. J Cell Sci. 120:3064-3074.

Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1988. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. EMBO J. 7:3679-3684.

Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1989. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. Cell Regul. 1:37-44.

Nakagawa, H., K. Koyama, Y. Murata, M. Morito, T. Akiyama, and Y. Nakamura. 2000. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. Oncogene. 19:210-216.

Nakamura, T., T. Hayashi, Y. Mimori-Kiyosue, F. Sakaue, K. Matsuura, S. Iemura, T. Natsume, and T. Akiyama. 2010. The PX-RICS-14-3-3zeta/theta complex couples N-cadherin-beta-catenin with dynein-dynactin to mediate its export from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 285:16145-16154.

Nejsum, L.N., and W.J. Nelson. 2007. A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity. J Cell Biol. 178:323-335.

Nejsum, L.N., and W.J. Nelson. 2009. Epithelial cell surface polarity: the early steps. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 14:1088-1098.

Nelson, W.J. 2008. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. Biochemical Society transactions. 36:149-155.

Neukirchen, D., and F. Bradke. 2011a. Cytoplasmic linker proteins regulate neuronal polarization through microtubule and growth cone dynamics. J Neurosci. 31:1528-1538.

Neukirchen, D., and F. Bradke. 2011b. Neuronal polarization and the cytoskeleton. Seminars in cell & developmental biology. 22:825-833.

Newton, C.N., M. Wagenbach, Y. Ovechkina, L. Wordeman, and L. Wilson. 2004. MCAK, a Kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro. FEBS letters. 572:80-84.

Niessen, C.M., D. Leckband, and A.S. Yap. 2011. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. Physiol Rev. 91:691-731.

Niu, G., and X. Chen. 2011. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. Theranostics. 1:30-47.

Nogales, E. 2001. Structural insight into microtubule function. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 30:397-420.

Nogales, E., and H.W. Wang. 2006. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. Curr Opin Struct Biol. 16:221-229.

Nogales, E., M. Whittaker, R.A. Milligan, and K.H. Downing. 1999. High-resolution model of the microtubule. Cell. 96:79-88.

Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing. 1998. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. Nature. 391:199-203.

Noles, S.R., and A. Chenn. 2007. Cadherin inhibition of beta-catenin signaling regulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells. Molecular and cellular neurosciences. 35:549-558.

Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J Mol Biol. 299:551-572.

Noren NK, WT Arthur and K Burridge K. 2003. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):13615-8.

Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci*. 118:2085-2092.

North, B.J., B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, and E. Verdin. 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 11:437-444.

Nurnberg, A., T. Kitzing, and R. Grosse. 2011. Nucleating actin for invasion. *Nature reviews. Cancer*. 11:177-187.

Oegema, K., C. Wiese, O.C. Martin, R.A. Milligan, A. Iwamatsu, T.J. Mitchison, and Y. Zheng. 1999. Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol*. 144:721-733.

Ohkawa, N., S. Sugisaki, E. Tokunaga, K. Fujitani, T. Hayasaka, M. Setou, and K. Inokuchi. 2008. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells*. 13:1171-1183.

Okada, K., F. Bartolini, A.M. Deaconescu, J.B. Moseley, Z. Dogic, N. Grigorieff, G.G. Gundersen, and B.L. Goode. 2010. Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *J Cell Biol*. 189:1087-1096.

Overduin, M., T.S. Harvey, S. Bagby, K.I. Tong, P. Yau, M. Takeichi, and M. Ikura. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*. 267:386-389.

Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. 8:1711-1717.

Ozer, R.S., and S. Halpain. 2000. Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*. 11:3573-3587.

Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*. 3:723-729.

Palazzo, A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*. 303:836-839.

Panda, D., H.P. Miller, and L. Wilson. 2002. Determination of the size and chemical nature of the stabilizing "cap" at microtubule ends using modulators of polymerization dynamics. *Biochemistry*. 41:1609-1617.

Park, C., W. Falls, J.H. Finger, C.M. Longo-Guess, and S.L. Ackerman. 2002. Deletion in Catna2, encoding alpha N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nature genetics*. 31:279-284.

Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:633-643.

Patel, S.D., C. Ciatto, C.P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T.M. Jessell, B. Honig, S.R. Price, and L. Shapiro. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*. 124:1255-1268.

Paturle-Lafanechere, L., B. Edde, P. Denoulet, A. Van Dorsselaer, H. Mazarguil, J.P. Le Caer, J. Wehland, and D. Job. 1991. Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry*. 30:10523-10528.

Peng, X., J.L. Maiers, D. Choudhury, S.W. Craig, and K.A. DeMali. 2012. alpha-Catenin uses a novel mechanism to activate vinculin. *J Biol Chem*. 287:7728-7737.

Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-527.

Peris, L., M. Thery, J. Faure, Y. Saoudi, L. Lafanechere, J.K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, and D. Job. 2006. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 174:839-849.

Peris, L., M. Wagenbach, L. Lafanechere, J. Brocard, A.T. Moore, F. Kozielski, D. Job, L. Wordeman, and A. Andrieux. 2009. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol*. 185:1159-1166.

Piedra, J., S. Miravet, J. Castano, H.G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol*. 23:2287-2297.

Pierre, P., J. Scheel, J.E. Rickard, and T.E. Kreis. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*. 70:887-900.

Pokutta, S., F. Drees, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2008. Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochemical Society transactions*. 36:141-147.

Pokutta, S., and W.I. Weis. 2000. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell*. 5:533-543.

Pokutta, S., and W.I. Weis. 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr Opin Struct Biol*. 12:255-262.

Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-465.

Ponti, A., M. Machacek, S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*. 305:1782-1786.

Poulain, F.E., S. Chauvin, R. Wehrle, M. Desclaux, J. Mallet, G. Vodjdani, I. Dusart, and A. Sobel. 2008. SCLIP is crucial for the formation and development of the Purkinje cell dendritic arbor. *J Neurosci*. 28:7387-7398.

Poulain, F.E., and A. Sobel. 2007. The "SCG10-LIke Protein" SCLIP is a novel regulator of axonal branching in hippocampal neurons, unlike SCG10. *Molecular and cellular neurosciences*. 34:137-146.

Poulain, F.E., and A. Sobel. 2010. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Molecular and cellular neurosciences*. 43:15-32.

Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2011. Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol*. 13:1457-1465.

Prakasam, A.K., V. Maruthamuthu, and D.E. Leckband. 2006. Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:15434-15439.

Price, L.S., A. Hajdo-Milasinovic, J. Zhao, F.J. Zwartkruis, J.G. Collard, and J.L. Bos. 2004. Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Biol Chem*. 279:35127-35132.

Purev, E., L. Neff, W.C. Horne, and R. Baron. 2009. c-Cbl and Cbl-b act redundantly to protect osteoclasts from apoptosis and to displace HDAC6 from beta-tubulin, stabilizing microtubules and podosomes. *Molecular biology of the cell*. 20:4021-4030.

Purro, S.A., L. Ciani, M. Hoyos-Flight, E. Stamatakou, E. Siomou, and P.C. Salinas. 2008. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. *J Neurosci*. 28:8644-8654.

Puthalakath, H., D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King, and A. Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*. 3:287-296.

Qiang, L., W. Yu, A. Andreadis, M. Luo, and P.W. Baas. 2006. Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci*. 26:3120-3129.

Radice, G.L., H. Rayburn, H. Matsunami, K.A. Knudsen, M. Takeichi, and R.O. Hynes. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol*. 181:64-78.

Raff, E.C., H.D. Hoyle, E.M. Popodi, and F.R. Turner. 2008. Axoneme beta-tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms. *Current biology : CB*. 18:911-914.

Raybin, D., and M. Flavin. 1977. Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin. *Biochemistry*. 16:2189-2194.

Redeker, V., N. Levilliers, J.M. Schmitter, J.P. Le Caer, J. Rossier, A. Adoutte, and M.H. Bre. 1994. Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science*. 266:1688-1691.

Redies, C. 2000. Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 61:611-648.

Ren, Y., R. Li, Y. Zheng, and H. Busch. 1998. Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *J Biol Chem*. 273:34954-34960.

Reynolds, A.B., and A. Roczniak-Ferguson. 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 23:7947-7956.

Rhee, J., T. Buchan, L. Zukerberg, J. Lilien, and J. Balsamo. 2007. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol*. 9:883-892.

Rhee, J., N.S. Mahfooz, C. Arregui, J. Lilien, J. Balsamo, and M.F. VanBerkum. 2002. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat Cell Biol*. 4:798-805.

Rice, L.M., E.A. Montabana, and D.A. Agard. 2008. The lattice as allosteric effector: structural studies of alphabeta- and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105:5378-5383.

Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302:1704-1709.

Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*. 5:605-607.

Riehl, R., K. Johnson, R. Bradley, G.B. Grunwald, E. Cornel, A. Lilienbaum, and C.E. Holt. 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron*. 17:837-848.

Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Cianci, and J.S. Morrow. 1995. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:8813-8817.

Rodionov, V., E. Nadezhdina, and G. Borisy. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:115-120.

Rodriguez, O.C., A.W. Schaefer, C.A. Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*. 5:599-609.

Rogers, G.C., N.M. Rusan, M. Peifer, and S.L. Rogers. 2008. A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase Drosophila cells. *Molecular biology of the cell*. 19:3163-3178.

Rogers, S.L., U. Wiedemann, U. Hacker, C. Turck, and R.D. Vale. 2004. Drosophila RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner. *Current biology : CB*. 14:1827-1833.

Rudiger, M. 1998. Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *Bioessays*. 20:733-740.

Rusan, N.M., K. Akong, and M. Peifer. 2008. Putting the model to the test: are APC proteins essential for neuronal polarity, axon outgrowth, and axon targeting? *J Cell Biol*. 183:203-212.

Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*. 4:408-415.

Schober, J.M., Y.A. Komarova, O.Y. Chaga, A. Akhmanova, and G.G. Borisy. 2007. Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J Cell Sci*. 120:1235-1244.

Schober, J.M., G. Kwon, D. Jayne, and J.M. Cain. 2012. The microtubule-associated protein EB1 maintains cell polarity through activation of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 417:67-72.

Shan, W., Y. Yagita, Z. Wang, A. Koch, A. Fex Svenningsen, E. Gruzglin, L. Pedraza, and D.R. Colman. 2004. The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem*. 279:55914-55923.

Shapiro, L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374:327-337.

Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003053.

Sharma, N., J. Bryant, D. Wloga, R. Donaldson, R.C. Davis, M. Jerka-Dziadosz, and J. Gaertig. 2007. Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J Cell Biol*. 178:1065-1079.

Sharp, D.J., and J.L. Ross. 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci*.

Shaw, R.M., A.J. Fay, M.A. Puthenveedu, M. von Zastrow, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 2007. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell*. 128:547-560.

Shewan, A.M., M. Maddugoda, A. Kraemer, S.J. Stehbens, S. Verma, E.M. Kovacs, and A.S. Yap. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Molecular biology of the cell*. 16:4531-4542.

Shtutman, M., A. Chausovsky, M. Prager-Khoutorsky, N. Schiefermeier, S. Boguslavsky, Z. Kam, E. Fuchs, B. Geiger, G.G. Borisy, and A.D. Bershadsky. 2008. Signaling function of alpha-catenin in microtubule regulation. *Cell Cycle*. 7:2377-2383.

Silvis, M.R., B.T. Kreger, W.H. Lien, O. Klezovitch, G.M. Rudakova, F.D. Camargo, D.M. Lantz, J.T. Seykora, and V. Vasioukhin. 2011. alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Science signaling*. 4:ra33.

Slaughter, T., and M.M. Black. 2003. STOP (stable-tubule-only-polypeptide) is preferentially associated with the stable domain of axonal microtubules. *Journal of neurocytology*. 32:399-413.

Slep, K.C., S.L. Rogers, S.L. Elliott, H. Ohkura, P.A. Kolodziej, and R.D. Vale. 2005. Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *J Cell Biol*. 168:587-598.

Sobel, A., M.C. Boutterin, L. Beretta, H. Chneiweiss, V. Doye, and H. Peyro-Saint-Paul. 1989. Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem*. 264:3765-3772.

Sosinsky, G.E., and B.J. Nicholson. 2005. Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*. 1711:99-125.

Steed, E., M.S. Balda, and K. Matter. 2010. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in cell biology*. 20:142-149.

Stehbens, S.J., A. Akhmanova, and A.S. Yap. 2009. Microtubules and cadherins: a neglected partnership. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 14:3159-3167.

Stehbens, S.J., A.D. Paterson, M.S. Crampton, A.M. Shewan, C. Ferguson, A. Akhmanova, R.G. Parton, and A.S. Yap. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci*. 119:1801-1811.

Stepanova, T., J. Slemmer, C.C. Hoogenraad, G. Lansbergen, B. Dortland, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, G. van Cappellen, A. Akhmanova, and N. Galjart. 2003. Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci*. 23:2655-2664.

Straube, A., and A. Merdes. 2007. EB3 regulates microtubule dynamics at the cell cortex and is required for myoblast elongation and fusion. *Current biology : CB*. 17:1318-1325.

Su, L.K., M. Burrell, D.E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res*. 55:2972-2977.

Sudo, H., and P.W. Baas. 2010. Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J Neurosci*. 30:7215-7226.

Suh, L.H., S.F. Oster, S.S. Soehrman, G. Grenningloh, and D.W. Sretavan. 2004. L1/Laminin modulation of growth cone response to EphB triggers growth pauses and regulates the microtubule destabilizing protein SCG10. *J Neurosci*. 24:1976-1986.

Szolajska, E., and J. Chroboczek. 2011. Faithful chaperones. *Cell Mol Life Sci*. 68:3307-3322.

Taguchi, K., T. Ishiuchi, and M. Takeichi. 2011. Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J Cell Biol*. 194:643-656.

Tahirovic, S., and F. Bradke. 2009. Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a001644.

Takai, Y., W. Ikeda, H. Ogita, and Y. Rikitake. 2008. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 24:309-342.

Takeichi, M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol*. 75:464-474.

Tanaka, D.H., M. Yanagida, Y. Zhu, S. Mikami, T. Nagasawa, J. Miyazaki, Y. Yanagawa, K. Obata, and F. Murakami. 2009. Random walk behavior of migrating cortical interneurons in the marginal zone: time-lapse analysis in flat-mount cortex. *J Neurosci*. 29:1300-1311.

Tassin, A.M., B. Maro, and M. Bornens. 1985a. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro. *J Cell Biol*. 100:35-46.

Tassin, A.M., M. Paintrand, E.G. Berger, and M. Bornens. 1985b. The Golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis. *J Cell Biol*. 101:630-638.

Teng, J., T. Rai, Y. Tanaka, Y. Takei, T. Nakata, M. Hirasawa, A.B. Kulkarni, and N. Hirokawa. 2005. The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium. *Nat Cell Biol*. 7:474-482.

Tepass, U., K. Truong, D. Godt, M. Ikura, and M. Peifer. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 1:91-100.

Thoumine, O. 2008. Interplay between adhesion turnover and cytoskeleton dynamics in the control of growth cone migration. *Cell adhesion & migration*. 2:263-267.

Thoumine, O., M. Lambert, R.M. Mege, and D. Choquet. 2006. Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Molecular biology of the cell*. 17:862-875.

Toyoshima, F., and E. Nishida. 2007. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J*. 26:1487-1498.

Tsvetkov, A.S., A. Samsonov, A. Akhmanova, N. Galjart, and S.V. Popov. 2007. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell motility and the cytoskeleton*. 64:519-530.

Tunggal, J.A., I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Gunzel, M. Fromm, R. Kemler, T. Krieg, and C.M. Niessen. 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J*. 24:1146-1156.

Uchida, N., Y. Honjo, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and M. Takeichi. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*. 135:767-779.

Valenzuela, P., M. Quiroga, J. Zaldivar, W.J. Rutter, M.W. Kirschner, and D.W. Cleveland. 1981. Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by alpha and beta tubulin mRNAs. *Nature*. 289:650-655.

Valetti, C., D.M. Wetzel, M. Schrader, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.E. Kreis, and T.A. Schroer. 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Molecular biology of the cell*. 10:4107-4120.

Vallee, R.B., R.J. McKenney, and K.M. Ori-McKenney. 2012. Multiple modes of cytoplasmic dynein regulation. *Nat Cell Biol*. 14:224-230.

van Horck, F.P., M.R. Ahmadian, L.C. Haeusler, W.H. Moolenaar, and O. Kranenburg. 2001. Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *J Biol Chem*. 276:4948-4956.

Vasioukhin, V., C. Bauer, L. Degenstein, B. Wise, and E. Fuchs. 2001. Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell*. 104:605-617.

Villasante, A., D. Wang, P. Dobner, P. Dolph, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. 1986. Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol*. 6:2409-2419.

Vitre, B., F.M. Coquelle, C. Heichette, C. Garnier, D. Chretien, and I. Arnal. 2008. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nat Cell Biol*. 10:415-421.

Votin, V., W.J. Nelson, and A.I. Barth. 2005. Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J Cell Sci*. 118:5699-5708.

Wang, D., A. Villasante, S.A. Lewis, and N.J. Cowan. 1986. The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol*. 103:1903-1910.

Wang, H.W., and E. Nogales. 2005. Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature*. 435:911-915.

Watabe-Uchida, M., K.A. John, J.A. Janas, S.E. Newey, and L. Van Aelst. 2006. The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron*. 51:727-739.

Watanabe, T., J. Noritake, M. Kakeno, T. Matsui, T. Harada, S. Wang, N. Itoh, K. Sato, K. Matsuzawa, A. Iwamatsu, N. Galjart, and K. Kaibuchi. 2009. Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci*. 122:2969-2979.

Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Developmental cell*. 7:871-883.

Waterman-Storer, C.M., W.C. Salmon, and E.D. Salmon. 2000. Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. 11:2471-2483.

Wen, Y., C.H. Eng, J. Schmoranzer, N. Cabrera-Poch, E.J. Morris, M. Chen, B.J. Wallar, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 6:820-830.

White, C.D., H.H. Erdemir, and D.B. Sacks. 2012. IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions. *Cellular signalling*. 24:826-834.

Williams, E.J., J. Furness, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1994. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*. 13:583-594.

Williams, E.J., G. Williams, F.V. Howell, S.D. Skaper, F.S. Walsh, and P. Doherty. 2001. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem*. 276:43879-43886.

Wittmann, T., G.M. Bokoch, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J Cell Biol*. 161:845-851.

Wittmann, T., G.M. Bokoch, and C.M. Waterman-Storer. 2004. Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *J Biol Chem*. 279:6196-6203.

Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci*. 114:3795-3803.

Wu, Y., X. Jin, O. Harrison, L. Shapiro, B.H. Honig, and A. Ben-Shaul. 2010. Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:17592-17597.

Xing, Y., K. Takemaru, J. Liu, J.D. Berndt, J.J. Zheng, R.T. Moon, and W. Xu. 2008. Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure*. 16:478-487.

Xu, G., A.W. Craig, P. Greer, M. Miller, P.Z. Anastasiadis, J. Lilien, and J. Balsamo. 2004. Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J Cell Sci*. 117:3207-3219.

Xu, W., and D. Kimelman. 2007. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci*. 120:3337-3344.

Yaffe, D., and O. Saxel. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 270:725-727.

Yagita, Y., T. Sakurai, H. Tanaka, K. Kitagawa, D.R. Colman, and W. Shan. 2009. N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation. *Journal of neuroscience research*. 87:3331-3342.

Yamada, S., and W.J. Nelson. 2007. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 178:517-527.

Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889-901.

Yanagisawa, M., I.N. Kaverina, A. Wang, Y. Fujita, A.B. Reynolds, and P.Z. Anastasiadis. 2004. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem*. 279:9512-9521.

Yap, A.S., B.R. Stevenson, K.C. Abel, E.J. Cragoe, Jr., and S.W. Manley. 1995a. Microtubule integrity is necessary for the epithelial barrier function of cultured thyroid cell monolayers. *Experimental cell research*. 218:540-550.

Yap, A.S., B.R. Stevenson, J.R. Keast, and S.W. Manley. 1995b. Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation. *Endocrinology*. 136:4672-4680.

Yokota, Y., W.Y. Kim, Y. Chen, X. Wang, A. Stanco, Y. Komuro, W. Snider, and E.S. Anton. 2009. The adenomatous polyposis coli protein is an essential regulator of radial glial polarity and construction of the cerebral cortex. *Neuron*. 61:42-56.

Yonemura, S., Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata. 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol*. 12:533-542.

Yoshida, K., and T. Soldati. 2006. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci*. 119:3833-3844.

Yu, W., L. Qiang, J.M. Solowska, A. Karabay, S. Korulu, and P.W. Baas. 2008. The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Molecular biology of the cell*. 19:1485-1498.

Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z, Geiger B. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2000 Apr;2(4):191-6.

Zhang, H., and M. Labouesse. 2010. The making of hemidesmosome structures in vivo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 239:1465-1476.

Zhang, T., K.J. Zaal, J. Sheridan, A. Mehta, G.G. Gundersen, and E. Ralston. 2009. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J Cell Sci*. 122:1401-1409.

Zheng, Y., M.L. Wong, B. Alberts, and T. Mitchison. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*. 378:578-583.

Zhou, F.Q., J. Zhou, S. Dedhar, Y.H. Wu, and W.D. Snider. 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*. 42:897-912.

Ziegler, W.H., R.C. Liddington, and D.R. Critchley. 2006. The structure and regulation of vinculin. *Trends in cell biology*. 16:453-460.